

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. Mai 2003 (22.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/041859 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: B01J 20/32,  
G01N 30/48, 30/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12594

(22) Internationales Anmeldedatum:  
12. November 2002 (12.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 55 984.4 15. November 2001 (15.11.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG  
[DE/DE]; 55216 Ingelheim/Rhein (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HALMER, Lothar  
[DE/DE]; Amriswilstrasse 7, 88400 Biberach an der Riss  
(DE). HOLZER, Margit [DE/DE]; Edith-Stein-Weg 10/3,  
88400 Biberach (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGEL-  
HEIM PHARMA KG; Binger Strasse 173, 55216  
Ingelheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR REDUCING LIGAND LEAKAGE FROM AFFINITY CHROMATOGRAPHY MATRICES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REDUKTION DES LIGANDEN-leakage VON AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE-  
MATRICES

(57) Abstract: The invention relates to a method for (pre)treating affinity chromatography matrices, preferably protein A matrices, comprising at least one surface active substance for reducing ligand leakage. Treating the affinity chromatography matrix according to the invention makes it possible to obtain a constant quality of the affinity chromatography matrix thereby representing an important requirement for the suitability/use in biopharmaceutical processes. The invention also relates to methods for determining the ligand leakage.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur (Vor)Behandlung von Affinitäts-chromatographie-Matrices, bevorzugt von Protein A-Matrices, mit zumindest einer oberflächenaktiven Substanz zur Verringerung des Liganden-leakage. Durch die erfindungsgemäße Behandlung der Affinitätschromatographie-Matrix kann in Bezug auf das Liganden-leakage eine konstante Qualität der Affinitätschromatographie-Matrix erzielt werden, was eine wichtige Voraussetzung für deren Eignung / Einsatz in biopharmazeutischen Prozessen darstellt. Ferner umfasst die vorliegende Erfindung Methoden zur Bestimmung der Li-ganden-leakage.



WO 03/041859 A1

BEST AVAILABLE COPY

## Verfahren zur Reduktion des Liganden-*leakage* von Affinitätschromatographie-Matrices

### Felder der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Affinitätschromatographie-Matrices, das geeignet ist das Liganden-*leakage* zu verringern. Darüber hinaus betrifft die Erfindung low-*leakage* Affinitätschromatographie-Matrices sowie Methoden zur Bestimmung der Liganden-*leakage*.

### Hintergrund

Affinitätschromatographie-Matrices, nachfolgend auch als Affinitätsmatrices bezeichnet, werden bei der industriellen Reinigung von verschiedenen Substanzen eingesetzt. Über immobilisierte Liganden lassen sich Substanzen spezifisch anreichern und reinigen, die eine gewisse Affinität zu dem jeweils verwendeten Liganden besitzen. Für die industrielle Aufreinigung von Antikörpern, insbesondere die Reinigung monoklonaler Antikörper, hat sich die Verwendung von immobilisiertem Protein A als initialen Reinigungsschritt bewährt. Hierbei binden Antikörper aus der mobilen Phase spezifisch an den Protein A-Liganden, der kovalent an einen Träger (z.B. Sepharose) gekoppelt ist. Protein A aus *Staphylococcus aureus* (wildtyp Protein A) sowie gentechnisch verändertes, rekombinantes Protein A (rec. Protein A) interagiert über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der konstanten Region (Fc-Fragment) der Antikörper. Diese spezifische Interaktion kann ausgenutzt werden um Prozess-bedingte Kontaminanten, wie Wirtszellproteine und/oder Medienbestandteile, effizient von dem Antikörper abzutrennen. Durch eine Veränderung des pH-Werts kann die Interaktion zwischen Antikörper und Protein A-Liganden gezielt aufgelöst und die Antikörper von der stationären Phase freigesetzt bzw. eluiert werden. Bei der Elution lösen sich erfahrungsgemäß nicht nur die gewünschten Antikörper, sondern in Abhängigkeit von der Stabilität der eingesetzten Protein A-Matrix zu einem gewissen Anteil auch Protein A, also der Ligand selbst. Das Ablösen des kovalent an die Säulenmatrix gekoppelten Protein A wird als „Protein A-*leakage*“ oder generell als „Liganden-*leakage*“ bezeichnet, ein Effekt der bei der Verwendung von Affinitätschromatographie-Matrices generell zu beobachten ist. Das Ausmaß des Liganden-*leakages* hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen wird das Liganden-*leakage* von der Kopplungseffizienz mit der der Ligand an einen Träger gekoppelt ist, beeinflusst. Eine geringe Kopplungseffizienz fördert erfahrungsgemäß das Liganden-*leakage*. Zum anderen scheint Liganden-*leakage* auch durch die speziellen

Prozessbedingungen beeinflusst zu werden unter denen das Chromatographieverfahren durchgeführt wird.

Die „*leakage*-Rate“ des eingesetzten Liganden, also die Menge an Ligand die pro Einheit Matrix oder pro Einheit zu reinigende Substanz von der Säule gewaschen wird, ist ein wichtiges Qualitätskriterium der verwendeten Affinitätschromatographie-Matrices. In Folge eines zu hohen Liganden-*leakage* kommt es regelmäßig zu einer kritischen, qualitätsrelevanten Kontamination des zu reinigenden pharmazeutischen Wirkstoffs. Aufwendige *downstream* Reinigungsschritte sind erforderlich, um den Wirkstoff wieder von dem Liganden zu trennen. Andernfalls besteht die Gefahr, dass unzureichend gereinigte pharmazeutische Erzeugnisse im Patienten unerwünschte Nebenwirkungen auslösen, bedingt durch eine zu hohe Ligandenkonzentration.

Zur Reduktion des Protein A-*leakages* in industriellen Prozessen wird (kann) vor der Erstbenutzung der Protein A-Matrix und nach einer längeren Lagerung der Protein A-Matrix eine Vorbehandlung der Säulenmatrix unter stringenten Pufferbedingungen durchgeführt (werden). Empfohlen wird eine Vorbehandlung der Matrix mit einer chaotropen Substanz, wie zum Beispiel mit 6 M Harnstoff oder 6 M Guanidinhydrochlorid (1 Bettvolumen).

Neben dieser Vorbehandlung wird die Säulenmatrix vor und nach jedem Säulenlauf gereinigt. Die entsprechenden Verfahren dienen primär der Erhaltung der Prozess-Hygiene (CIP). Für die CIP / Gelreinigung von Protein A-Sepharose wird empfohlen, die Säulenmatrix mit zwei Säulenvolumen (*column volume* = *cv*) eines 0,1%igem nicht-ionischen Detergenz bei 37°C zu spülen. Die Kontaktzeit wird mit einer Minute angegeben. Zur Reduktion möglicher mikrobieller Kontaminationen wird zusätzlich geraten die Matrix für 6 Std. mit 2% Hibitan-(2)-Gluconat und 20% EtOH zu behandeln und anschließend sorgfältig mit einem Bindungspuffer (pH 7-8) zu spülen. Für die CIP von „*Streamline rProtein A*“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) wird eine Behandlung der Protein A-Matrix mit 5% Natrium-N-Lauroylsarcosinat, 20 mM EDTA and 0,1 M NaCl in Phosphat-Puffer angegeben (Manual „*Streamline rProtein A*“, Amersham Pharmacia Biotech, Code 18-1115-67). Wie eigene Untersuchungen belegen (Tabelle 1, Figur 1) sind diese Verfahren jedoch nicht hinreichend wirksam, um das Protein A-*leakage* auf ein zuverlässiges und reproduzierbar niedriges Maß zu reduzieren.

Für den Herstellungsprozeß biopharmazeutischer Arzneimittel ist es von größter Bedeutung stabile Protein A-Matrices mit einem reproduzierbar niedrigen Protein A-*leakage* einzusetzen. Solche Matrices, mit konstant niedrigem *Leakage* sind jedoch zur Zeit nicht ausreichend in

zuverlässiger Qualität verfügbar. Beispielhaft dargestellt ist dies in Tabelle 1 (Figur 1) für verschiedene Chargen einer Protein A-Sepharose.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein geeignetes Verfahren zur Vorbehandlung und / oder Behandlung von Affinitätschromatographie-Matrices zu entwickeln und zu etablieren, das eine Reduktion des Liganden-*leakage* auf ein reproduzierbar niedriges Niveau gewährleistet und somit im Ergebnis eine konstante Qualität von Affinitätsmatrices garantieren kann. Von besonderem Interesse war ein entsprechendes Verfahren für die Vorbehandlung von Protein A-Matrices zu etablieren, die insbesondere zur Reinigung von Antikörpern verwendet werden.

## **Beschreibung der Erfindung**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Vorbehandlung und / oder Behandlung von Affinitätschromatographie-Matrices, das geeignet ist das Liganden-*leakage* zuverlässig und reproduzierbar zu reduzieren und somit eine konstante Qualität von Affinitätschromatographie-Matrices zu garantieren, ohne dass dabei die Aktivität der Affinitätschromatographie-Matrix und/oder deren chromatographische Eigenschaft negativ beeinflusst werden. Nachfolgend meint der Begriff „Behandlung“ auch eine Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix vor ihrer Verwendung zu chromatographischen Zwecken.

Überraschenderweise konnte ein Verfahren gefunden werden, das als wesentlichen Verfahrensschritt eine Behandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer oberflächenaktiven Substanz enthält. Oberflächenaktive Substanzen im Sinne der Erfindung sind sowohl nicht-ionische als auch ionische Detergenzien, einschließlich zwitterionischen Detergenzien. Eine entsprechende erfindungsgemäße Behandlung einer Affinitätschromatographie-Matrix wird nachfolgend auch als „Detergenzbehandlung“ bezeichnet.

Die Effektivität des erfindungsgemäßen Verfahrens wird maßgeblich von der Behandlungsdauer (Kontaktzeit), dem Volumen, der Temperatur und der verwendeten oberflächenaktiven Substanz bestimmt. Überraschenderweise zeigte sich, dass zwischen Behandlungsdauer und Reduktion des Liganden-*leakage* zu Beginn der Behandlungsdauer keine lineare Beziehung besteht. Es stellte sich heraus, dass eine Kontaktzeit (Behandlungsdauer) von weniger als 16 bis 20 Std. keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Reduktion des Liganden-*leakage* bei Raumtemperatur (RT) hatte (Figuren 11 und 14). Mit Raumtemperatur sind Temperaturen zwischen 15 und 25°C gemeint. Erst ab einer Behandlungszeit von ca. 16 Std. trat eine deutliche Reduktion des

Liganden-*leakage* ein. Dabei ist die in Figur 11 dargestellte Menge an Protein A umgekehrt proportional zum Liganden-*leakage* das eine Protein A-Matrix nach entsprechender Vorbehandlung noch zeigt.

Mit zunehmender Behandlungsdauer kann das Liganden-*leakage* weiter reduziert werden. Die benötigte Behandlungsdauer reduziert sich hierbei mit steigender Temperatur (Verfahrenstemperatur). Bei einer Temperatur oberhalb von 25°C, insbesondere bei 30 – 40°C und im Besonderen bei 36 – 38°C reduziert sich die erforderliche Behandlungsdauer des erfindungsgemäßen Verfahrens, die erforderlich ist um das Liganden-*leakage* reproduzierbar niedriges Maß zu reduzieren ohne dabei die Aktivität der Affinitätschromatographie-Matrix oder die chromatographischen Eigenschaften zu beeinträchtigen, auf 4 – 16 Std. (Figur 14). Die Figur 12 verdeutlicht, dass eine weitere Temperaturerhöhung, beispielsweise bis 55°C einen weiteren positiven Effekt auf das Liganden-*leakage* hat, also zu einer erfindungsgemäßen Verringerung des Liganden-*leakage* führt.

Erfindungsgemäß ist demnach ein Verfahren zur Reduktion der Liganden-*leakage*, bestehend aus einer Behandlung einer Affinitätschromatographie-Matrix mit mindestens einer oberflächenaktiven Substanz für mindestens 16 Std., bevorzugt für 16 – 48 Std., bei 15 - 25°C (RT). Das Verfahren lässt sich bei gleicher Behandlungszeit (16 – 48 Std.) allerdings auch bei Temperaturen unterhalb von 15°C (RT) durchführen, wobei eine Behandlung bei RT bevorzugt ist. Bei Temperaturen oberhalb von 25°C, insbesondere zwischen 30 - 40°C, insbesondere bei 36 - 38°C beträgt die erfindungsgemäße Behandlungsdauer mindestens 4 Std. Besonders bevorzugt ist hierbei ein entsprechendes Verfahren bei dem die Kontaktzeit zwischen 4 und 16 Std. liegt. Eine weitere Temperaturerhöhung auf Temperaturen oberhalb von 40°C können zu einer weiteren Verkürzung der Kontaktzeit führen. Bevorzugt sind hier insbesondere Temperaturen bis etwa 55°C, insbesondere Temperaturen zwischen 40 - 55°C, insbesondere zwischen 50 – 55°C. Die optimale Kontaktzeit in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur kann sehr leicht und ohne erheblichen Aufwand mit Hilfe einer der in dieser Anmeldung beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Liganden-*leakage* (*Inkubationstest, Small Scale-Verfahren*) ermittelt werden. Generell bevorzugt ist ein Verfahren bei dem die Verfahrenstemperatur zwischen 25 und 55°C und die Kontaktzeit zwischen 4 und 16 Std. beträgt. Bei Raumtemperatur oder darunter beträgt die Kontaktzeit des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens 16 Std., bevorzugt zwischen 16 – 48 Std.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Behandlung der Affinitätschromatographie-Matrix für mindestens 16 Std. bei RT mit mindestens 5 – 30 Bettvolumen, vorzugsweise mit nicht weniger als 10 Bettvolumen, zumindest einer oberflächenaktiven Substanz. Darüber hinaus gilt ein Verfahren als erfindungsgemäß, bei dem  
5 die Affinitätschromatographie-Matrix für mindesten 4 Std. bei einer Temperatur von 36- 38°C mit mindestens 5 – 15 Bettvolumen zumindest einer oberflächenaktiven Substanz behandelt wird. In letzterem Verfahren kann die Temperatur auch über 38°C erhöht werden, beispielsweise auf Temperaturen bis etwa 55°C. Wie die Figur 12 verdeutlicht, führt eine entsprechende Temperaturerhöhung zu einer weiteren Verringerung des Liganden-*leakage*.

10 Erfindungsgemäß sind aber auch solche Verfahren, bei denen die Kontaktzeit weniger als 4 Std. für Temperaturen oberhalb von 25°C und weniger als 16 Std. für Temperaturen bis 25°C betragen, sofern das Verfahren in seiner Gesamtheit in der Lage ist, das Liganden-*leakage* auf ein reproduzierbar niedriges Maß zu reduzieren, ohne dabei die Aktivität der Affinitätschromatographie-Matrix oder die chromatographischen Eigenschaften zu beeinträchtigen. Der  
15 positive Einfluss steigender Reaktionstemperaturen auf die Verringerung des Liganden-*leakage* ergibt sich beispielhaft aus Figur 12.

Ein reproduzierbar niedriges Niveau im Sinne der Erfindung meint beispielsweise, dass das Liganden-*leakage* einer Affinitätschromatographie-Matrix, bestimmt nach einer der nachfolgend beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Liganden-*leakage* (*Inkubationstest, Small Scale-*  
20 *Verfahren*), einen Wert kleiner 80 ng Ligand / mg Affinitätsmatrix aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beträgt die Liganden-*leakage* bestimmt nach einer dieser Methoden einen Wert kleiner 40 ng Ligand / mg Affinitätsmatrix, in einer besonders bevorzugten Ausführung einen Wert von kleiner 20 ng Ligand / mg Affinitätsmatrix, und in einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung einen Wert von kleiner  
25 10 ng Ligand / mg Affinitätsmatrix.

Die hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren sind besonders geeignet, die Liganden-*leakage* von Protein A-Matrices zu verringern. Folglich gelten die hier beschriebenen Verfahren als erfindungsgemäß, wenn sie zur Behandlung von Protein A-Matrices eingesetzt werden. Protein A-Matrices im Sinne der Erfindung sind Affinitätschromatographie-Matrices die  
30 immobilisiertes Protein A als Liganden enthalten. Dies umfasst Affinitätsmatrices die wildtyp Protein A, beispielsweise aus *Staphylococcus aureus* als Liganden enthalten. Eine Beschreibung von Protein A befindet sich u.a. bei Lofdahl, S. et al., 1983 und Lindmark et. al., 1983. Darüber

hinaus bezieht sich die Erfindung auch auf Matrices mit rekombinant hergestelltem Protein A als Liganden. Rekombinantes Protein A ist beispielhaft von Duggleby C.J. und Jones, S.A., 1983 oder Li, R. et al., 1998 beschrieben und dem Fachmann bekannt.

Das Protein A kann hierbei an verschiedene Trägermaterialien wie zum Beispiel an Agarosen, Polysaccharide, Dextrane, Silica-Gele, Glas-beads gekoppelt sein. Eine nicht abschließende Aufstellung geeigneter Trägermaterialien findet sich in Harlow, E. und Lane, D. 1999. Ein häufig verwendetes Trägermaterial bilden auf Agarose basierende Materialien, wie z.B. die dem Fachmann bekannten „Sepharosen“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden. Spezielle Beispiele für Protein A-Sepharosen finden sich im Manual dieser Firma zu dem Thema „Affinity Chromatography“ aus dem Jahr 2001. Darüber hinaus sind dem Fachmann weitere Protein A-Chromatographie-Matrices bekannt, wie z.B. MabSelect (Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), STREAMLINE™ rProtein A, (Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Poros A (Millipore, Durham, England). Das erfindungsgemäße Verfahren schließt eine Behandlung der entsprechenden Matrices mit ein, wobei die Aufzählung der Matrices beispielhaft und nicht abschließend zu verstehen ist.

Die Kopplung des Liganden erfolgt in der Regel über freie Amino-, Carboxyl- oder Schwefel-Gruppen mittels Cyanogen-Bromid-Aktivierung, NHS-Aktivierung oder Thiol-Kopplung an die Trägermatrix. Siehe hierzu beispielhaft Manual „Affinity Chromatography“, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, 2001.

Neben einer Angabe der Liganden-*leakage* in ng Ligand / mg Affinitätsmatrix ist speziell für das Liganden-*leakage* von Protein A-Sepharose die Angabe in ng Protein A / mg Antikörper (= ppm) eine gebräuchliche Grösse, da hier die Konzentration des Liganden (Prozesskontaminante) in Bezug zur Konzentration des Antikörpers gesetzt wird. Die oben beschriebenen Zahlenwerte für ein reproduzierbar niedriges Niveau an Liganden-*leakage* in ng Ligand / mg Affinitätsmatrix entsprechen sich hierbei weitestgehend.

Demnach entspricht ein reproduzierbar niedriges Niveau an Protein A-*leakage* beispielhaft einem *Leakage*, bestimmt nach einer der nachfolgend beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Liganden-*leakage* (*Inkubationstest*, *Small Scale-Verfahren*), einem Wert von kleiner 80 ppm Protein A. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beträgt die Protein A-*leakage* bestimmt nach einer dieser Methoden einem Wert von kleiner 40 ppm Protein A, in einer besonders bevorzugten Ausführung einem Wert von kleiner 20 ppm Protein A, und in einer

weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung einem Wert von kleiner 10 ppm Protein A.

Die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens, mit der das Liganden-*leakage*, insbesondere das Protein A-*leakage*, verringert werden kann, kann dadurch gesteigert werden, dass die Matrix zusätzlichen Behandlungsschritten ausgesetzt ist. Als wirksam zeigte sich ein  
5 Verfahren, bei dem die Affinitätsmatrix zusätzlich zur der Detergenzbehandlung (mit mindestens einer oberflächenaktiven Substanz) mit einer chaotropen Substanz vor- und / oder nachbehandelt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens folgt dem Behandlungsschritt mit einer  
10 chaotropen Substanz ein Waschschriff mit einem für die Affinitätsmatrix stringenten Elutionspuffer. Mit einem „für die Affinitätsmatrix stringenten Elutionspuffer“ im Sinne der Erfindung sind solche Elutionspuffer gemeint, die eine spezifische Elution einer zu reinigenden Substanz von ihrem Liganden ermöglichen. Handelt es sich beispielsweise bei der zu reinigenden Substanz um einen Antikörper und bei dem Liganden um Protein A, so erfüllt ein  
15 saurer Elutionspuffer (pH 2,0 – 4,0) die Anforderungen eines stringenten Elutionspuffer im Sinne der Erfindung (Affinity Chromatography – Principles and Methods, Seite 63, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform folgt dem Waschschriff mit einem für die Affinitätsmatrix stringenten Puffer ein weiterer Waschschriff mit einem neutralen Puffer, dessen  
20 pH beispielsweise zwischen pH 6,5 – 8,5 liegt.

Demnach gelten solche Verfahren als erfindungsgemäß, die neben einer der oben beschriebenen erfindungsgemäßen „Detergenzbehandlung“ einen der folgenden Schritte beinhalten:

- (A) Behandlung der Matrix mit einer chaotropen Substanz; oder
- (B) Behandlung der Matrix mit einer chaotropen Substanz gefolgt von einem Waschschriff  
25 mit einem für die Affinitätsmatrix stringentem Elutionspuffer; oder
- (C) Behandlung der Matrix mit einer chaotropen Substanz, gefolgt von einem Waschschriff mit für die Affinitätschromatographie stringenten Elutionspuffer und einem neutralen Waschpuffer, bevorzugt pH 6,5 – 8,5,

insbesondere dann, wenn einer dieser Schritt der Detergenzbehandlung vorangestellt wird  
30 und/oder sich an diese anschließt. In einem besonders bevorzugten Verfahren handelt es sich bei



der chaotropen Substanz um Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, bevorzugt in einer Konzentration von 4 - 6 M.

Ein entsprechendes Verfahren ist besonders für die Verringerung der Liganden-*leakage* von Protein A-Matrices geeignet und gilt folglich als besonders erfindungsgemäß, wenn ein saurer Elutionspuffer, bevorzugt mit einem pH-Wert von 2,0 – 4,0 verwendet wird.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht in einem Verfahren, welches die folgenden Verfahrensschritte beinhaltet oder aus diesen besteht:

(A) Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer chaotropen Substanz, gefolgt von einem sauren Puffer, bevorzugt pH 2,0 – 4,0, und einem neutralen Puffer, bevorzugt pH 6,5 – 8,5;

(B) Behandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit zumindest einer oberflächenaktiven Substanz nach einem der oben beschriebenen Verfahren, das geeignet ist das Liganden-*leakage* zu reduzieren;

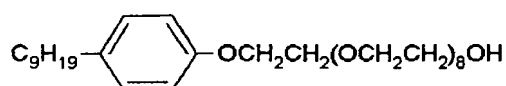
(C) Nachbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer chaotropen Substanz, gefolgt von einem sauren Puffer (pH 2,0 – 4,0) und einem neutralen Waschpuffer (pH 6,5 – 8,5).

Bei einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung, kann der saure Elutionspuffer durch einen beliebigen, für eine Affinitätsmatrix stringenten Elutionspuffer ersetzt werden. Bevorzugt lässt sich das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren wiederum zur Verringerung der Liganden-*leakage* von Protein A-Matrices verwenden.

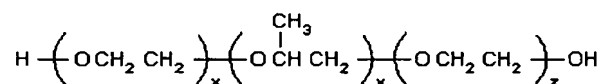
Oberflächenaktive Substanzen im Sinne der Erfindung sind sowohl nicht-ionische als auch ionische Detergenzien, insbesondere zwitterionische Detergenzien. Bei den nicht-ionischen Detergenzien handelt es sich bevorzugt um Vertreter der PEG-Alkylether, PEG-Sorbitanfettsäureester, Alkylphenyl-PEG-Ether oder PEO-PPO-Block-Co-Polymere. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden PEG-Alkylether wie Polyoxyethylen(23)laurylether (Brij 35,  $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ ,  $n \sim 23$ , CAS: 9002-92-0) und Polyoxyl-20-cetostearylether, oder PEG-Sorbitanfettsäureester (Polysorbat-Derivate) wie Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Polysorbat 20, CAS: 9005-64-5) oder Polyoxyethylen(20)sorbitan-monooleat (Polysorbat 80, CAS: 9005-65-6), oder Alkylphenyl-PEG-Ether (Octoxynol-Derivate), wie t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton-X-100, CAS: 9002-93-1), oder ein Nonylphenol-polyoxyethylenether wie Polyglycolether (*nonionic surfactants*) Typ NP-40 (Tergitol NP40, CAS: 127087-87-0) oder verzweigter Polyoxyethylen-nonylcyclohexylether

(Triton N-101,  $C_9H_{19}C_6H_{10}(OCH_2CH_2)_nOH$ , CAS: 123359-41-1), oder PEO-PPO-Block-Co-Polymere (Poloxamer-Derivate), wie Polyoxyethylen-polyoxypropylen-block-copolymer (Pluronic F 68, Lutrol F 68, Poloxamer 188, CAS: 9003-11-6 oder Poloxamer 407, Pluronic F 127, Lutrol F 127, CAS: 9003-11-6) verwendet. Darüber hinaus eignet sich auch die  
 5 Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) zur Behandlung der Affinitätsmatrices, so dass auch deren Verwendung als erfindungsgemäß gilt.

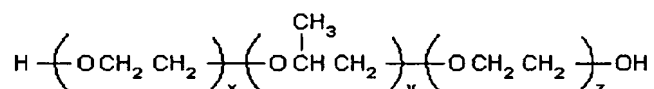
Unter Polyglycolether (*nonionic surfactants*) Typ NP-40 (Tergitol NP40, CAS: 127087-87-0) ist eine Verbindungen mit folgender Strukturformel zu verstehen:



Unter Polyoxyethylen-polyoxypropylen-block-copolymer (Pluronic F 68, Lutrol F 68,  
 10 Poloxamer 188, CAS: 9003-11-6) sind Verbindungen mit folgender Strukturformel zu verstehen:



Unter Polyoxyethylen-polyoxypropylen-block-copolymer (Pluronic F 127, Lutrol F 127,  
 Poloxamer 407, CAS: 9003-11-6) sind Verbindungen mit folgender Strukturformel zu verstehen:



Von den zwitterionischen Detergenzien eignen sich insbesondere 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propan-sulfonat (CHAPS, CAS: 75621-03-3) oder 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-2-hydroxy-1-propan-sulfonat (CHAPSO, CAS: 82473-24-3) für die erfindungsgemäße Behandlung der Matrices.  
 15

Die nicht-ionischen Detergenzien werden bevorzugt in einer Konzentration von 0,001 bis 5% (v/v) eingesetzt. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Polysorbat (20 und 80) in einer Konzentration > 0,005 % (v/v), Pluronic (F68) in einer Konzentration von > 0,001 % (v/v) und  
 20 Triton-X-100 in ein Konzentration von > 0,001 % (v/v) ist. In einer weiteren Ausführung der Erfindung wird Polysorbat, bevorzugt Polysorbat 20, in einer Konzentration von 0,005 – 0,5 % (v/v), Pluronic, bevorzugt Pluronic F68, und Triton-X-100 in ein Konzentration von > 0,001 – 0,1% (v/v) eingesetzt. Polyethylenglycol eignet sich ebenfalls in einer Konzentration von > 0,01 (v/v), wird aber bevorzugt in einer Konzentration von 0,01- 1% verwendet.

Zwitterionische Detergenzien werden bevorzugt in einer Konzentration von 0,01 bis 1% (v/v) eingesetzt, besonders bevorzugt ist die Verwendung der Detergenzien CHAPS und/oder CHAPSO in einer Konzentration > 0,01% (v/v). In einer weiteren Ausführungsform beträgt die Konzentration von CHAPS und/oder CHAPSO 0,01 - 1% (v/v).

- 5 Erfindungsgemäß ist auch die Behandlung der Affinitätschromatographie-Matrices, bevorzugt die Behandlung Protein A-Matrices mit einer Kombination aus den besagten Detergenzien.

Neben den Verfahren zur Reduktion der Liganden-*leakage* sind auch „*low leakage*“ Affinitätschromatographie-Matrices Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die nach einem der oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren zur Verringerung der Liganden-*leakage*  
10 behandelt wurden. In einer bevorzugten Ausführung sind *low leakage* Protein A-Matrices Gegenstand der vorliegenden Erfindung, sofern sie nach einem entsprechenden Verfahren zur Verringerung der Protein A-*leakage* behandelt wurden. *Low leakage* Protein A-Matrices meint sowohl Matrices, die wildtyp, wie zum Beispiel Protein A von *Staphylococcus aureus*, oder rekombinant hergestelltes Protein A enthalten. Beispielhaft zu nennen sind: Protein A-Sepharosen  
15 und Protein A-Sepharose-beads (z.B. STREAMLINE™ rProteinA der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), wobei die Aufzählung nur beispielhaft und nicht abschließend zu verstehen ist.

Zusätzlich zu den besagten Verfahren zur Verringerung der Liganden-*leakage* von Affinitäts-matrices sowie zu entsprechend behandelten *low leakage* Affinitätschromatographie-Matrices  
20 beinhaltet die vorliegende Erfindung Methoden zur Bestimmung der Liganden-*leakage*. Eine entsprechende Methode wird nachfolgend auch als „*Inkubationstest*“, eine weitere als „*Small-Scale-Verfahren*“ bezeichnet.

Der erfindungsgemäße Inkubationstest beinhaltet die nachfolgend beschriebenen Verfahrensschritte (A) – (C), in einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht der  
25 Inkubationstest aus diesen Verfahrensschritten:

- (A) Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix nach einem der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren, das geeignet ist die Liganden-*leakage* zu reduzieren;
- (B) Inkubation der vorbehandelten Affinitätschromatographie-Matrix mit einer zusätzlichen Lösung die auch als Probe bezeichnet wird; und

(C) Quantifizierung des Liganden in der zusätzlichen Lösung (Probe) über einen geeigneten quantitativen Test, wobei es bei dem quantitativen Test beispielsweise um einen Ligandenspezifischen ELISA handelt.

In einer besonderen Ausführungsform der hier dargestellten erfinderischen Methode zur Bestimmung der Liganden-*leakage* wird die Affinitätschromatographie-Matrix unter Schritt A wie folgt vorbehandelt:

In einem ersten Schritt (Schritt (A1)) erfolgt eine Behandlung der Affinitätsmatrix mit einer chaotropen Substanz, bevorzugt mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 4 – 6 M, gefolgt von einem Waschschriff mit einem für die Affinitätsmatrix stringenten Elutionspuffer, gefolgt von einem Waschschriff mit einem neutralen Puffer, bevorzugt mit einem pH-Wert von 6,5 – 8,5.

In Schritt (A2) erfolgt eine Behandlung der Affinitätsmatrix mit mehreren Bettvolumina, bevorzugt 5 - 30, zumindest einer oberflächenaktiven Substanz, wobei die Kontaktzeit mindestens 4 Std. und die Inkubationstemperatur zwischen 25 - 37°C beträgt. Die Temperatur kann jedoch auch über 37°C erhöht werden, beispielsweise auf Werte bis etwa 55°C.

In Schritt (A3) wird die Affinitätschromatographie-Matrix wiederum mit einer chaotropen Substanz, bevorzugt mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 4 – 6 M behandelt, gefolgt von einem Waschschriff mit einem für die Affinitätsmatrix stringenten Elutionspuffer, gefolgt von einem Waschschriff einem neutralen Puffer, bevorzugt mit einem pH-Wert von 6,5 – 8,5.

Bei der unter Schritt (B) erwähnten zusätzlichen Lösung, handelt es sich bevorzugt um eine Probe die dem Zwischenprodukt entspricht, welches unter Produktionsbedingungen als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie eingesetzt wird. Stellt die Affinitätschromatographie beispielsweise den initialen Reinigungsschriff dar, so kann es sich beispielhaft um die Ernteprobe eines Fermentationsprozesses handeln. Darüber hinaus ist aber auch die Verwendung von Zellkulturmedium oder eines beliebigen Puffers vorstellbar und erfindungsgemäß. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der zusätzlichen Probe um das Eluat, welches unter Prozessbedingungen gewonnen wird. In einer besonderen Ausführungsform beträgt die Kontaktzeit für die Probenbehandlung (Schritt B) nicht weniger als 8 Std., wobei die Inkubationstemperatur nicht unter 18°C liegt und bevorzugt etwa 37°C beträgt.

Die quantitative Bestimmung des Liganden kann über eine beliebige, dem Stand der Technik bekannte Meßmethode erfolgen, die geeignet ist, den Liganden zu quantifizieren. Im Falle eines Protein-haltigen Liganden ist beispielsweise eine Proteinbestimmung nach der Biuret- oder Lowry-Methode (Harris and Angal, 1995) möglich. Eine weitere Methode zur Quantifizierung von Protein- oder Peptid-Liganden liegt in der Ausnutzung von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen. Die Verwendung entsprechender Testsysteme, bei denen der Ligand über einen spezifischen, gegen diesen Liganden gerichteten Antikörper nachgewiesen wird, ist beispielhaft in „Immunoassay“, Diamandis, P. und Christopoulos T.K. (1996), beschrieben und für den Fachmann ohne erfinderisches Zutun durchführbar. Die hier aufgeführten Methoden sind beispielhaft und nicht als abschließende Aufzählung zu verstehen.

Besonders erfindungsgemäß sind die oben beschriebenen Ausführungsformen der Methode zur Bestimmung der Liganden-*leakage* von Protein A-Matrices. Bei einer entsprechenden Methode wird bevorzugt ein saurer Puffer, besonders bevorzugt ein Puffer mit einem pH-Wert von 2,0 – 4,0 als Elutionspuffer verwendet. Eine weitere Ausführungsform der Methode zur Bestimmung der Protein A-*leakage* ist in den Beispielen (s.u.) beschrieben. Darüber hinaus ist auch die Methode zur Bestimmung der Protein A-*leakage* der Figur 2 erfindungsgemäß.

Ein bevorzugtes Verfahren zum Nachweis von Protein A stellt beispielsweise die Verwendung eines sog. „Sandwich Protein A ELISA“ dar, der auch geringe Mengen (ppm) an Protein A detektieren kann. Das Prinzip eines solchen Tests ist beispielhaft in „ELISA“, Kemeny, D.M. (1994), beschrieben, und kann durch den Fachmann ohne weiteres angewendet werden. Für den Protein A-ELISA wird ein hochaffiner anti-Protein A Antikörper an ein Reaktionsgefäß, vornehmlich an eine 96-Loch Mikrotiterplatte fixiert. Der Protein A Nachweis in der zu analysierenden Probe erfolgt nach Inkubation der Probe mit dem fixierten anti-Protein A-Antikörper über einen zweiten, ebenfalls hochaffinen anti-Protein A-Antikörper, der zusätzlich mit einem Enzym, beispielsweise einer Peroxidase oder alkalische Phosphatase markiert ist. Entsprechende unmarkierte und/oder mit einem Enzym markierte anti-Protein A-Antikörper sind dem Fachmann bekannt und z.B. über die Firmen American Research Products, Inc. (Belmont, USA), Biogenesis Ltd. (Poole, England) oder O.E.M. Concepts, Inc. (New Jersey, USA) zu beziehen. Ein entsprechender Inkubationstest dient auch als Referenzmethode für die Bestimmung der erfindungsgemäßen Grenzwerte für ein reproduzierbar niedriges Niveau an Liganden-*leakage*, insbesondere für ein zulässiges Protein A-*leakage*.

Erfindungsgemäß sind auch solche Inkubationstests, die auf dem selbem Verfahrensprinzip beruhen und sich lediglich durch Änderungen der Pufferzusammensetzung und/oder der Inkubationsbedingungen unterscheiden. Tests, die auf dem selben Verfahrensprinzip beruhen sind auch solche, bei denen eine Affinitätsmatrix mit unterschiedlichen Lösungen inkubiert wird und die Menge an Ligand zumindest in einer Lösung als Maß für die Liganden-*leakage* bestimmt wird.

Erfindungsgemäß ist darüber hinaus eine weitere Methode zu Bestimmung des Liganden-*leakage*. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, dass zur Bestimmung der Liganden-*leakage* unter Prozessbedingungen angewendet werden kann und im weiteren auch als „*Small-Scale* Verfahren“ bezeichnet wird. Die erfindungsgemäße Methode beinhaltet oder besteht aus den nachfolgend beschriebenen Verfahrensschritten:

- (A) Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix nach einem der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren, welches geeignet ist das Liganden-*leakage* zu reduzieren;
- (B) Beladen der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer zu reinigenden Substanz;
- (C) Waschen der Affinitätschromatographie-Matrix mit einem spezifischen Waschpuffer;
- (D) Inkubation der Affinitätschromatographie-Matrix mit einem stringenten Elutionspuffer;
- (E) Quantifizierung des Liganden im Elutionspuffer über einen geeigneten quantitativen Test, wobei es sich bei dem quantitativen Test beispielsweise um einen Liganden-spezifischen ELISA handelt.

Erfindungsgemäß ist die Methode sowohl bei Anwendung im „*batch*-Verfahren“ als auch für „*säulenchromatographische Verfahren*“. Eine bevorzugte Ausführungsform dieser Methode dient zur Bestimmung der Liganden-*leakage* von Protein A-Matrices. Eine entsprechende erfindungsgemäße Methode ist in den Beispielen beschrieben. Eine besondere Ausführungsform stellt die Methode zur Bestimmung der Protein A-*leakage* dar, die im wesentlichen dem Verfahren entspricht, welches in Figur 3 der Zeichnungen dargestellt ist.

Erfindungsgemäß ist darüber hinaus auf ein Verfahren bei dem eines der erfindungsgemäßen Verfahren zur Verringerung der Liganden-*leakage* von Affinitätschromatographie-Matrices bei der Reinigung biopharmazeutischer Produkte eingesetzt wird. Dem zur Folge ist auch ein Verfahren, bei dem *low-leakage* Affinitätschromatographie-Matrices zur Reinigung biopharmazeutische Produkte eingesetzt werden, Gegenstand der Erfindung. *Low-leakage* Affinitätsmatrices im Sinne der Erfindung sind solche Matrices, die nach einem der hier

beschriebenen, erfinderischen Verfahren behandelt bzw. vorbehandelt werden. Biopharmazeutische Produkte im Sinne der Erfindung sind Proteine, Peptide, Nukleinsäuren sowie deren Derivate. Erfindungsgemäß ist folglich auch die Verwendung eines Verfahren zur Verringerung der Liganden-*leakage* von Affinitätschromatographie-Matrices sowie die  
5 Verwendung von *low-leakage* Affinitätschromatographie-Matrices bei der Reinigung biopharmazeutischer Produkte.

Eine besondere Ausführungsform besteht in einem Verfahren, bei dem eines der hier beschriebenen Verfahren zur Verringerung der Protein A-*leakage* bei der Reinigung von Antikörpern oder chimären Antikörper-Molekülen, einschließlich deren Fragmente oder Derivate  
10 verwendet wird, sowie die Verwendung als solches. Erfindungsgemäß ist folglich auch ein Verfahren bei dem *low leakage* Protein A-Matrices zur Reinigung besagter Antikörpern, chimärer Antikörper-Molekülen, einschließlich deren Fragmente oder Derivate verwendet werden, also ein Verfahren bei dem Protein A-Matrices, die nach einem der hier beschrieben erfinderischen Verfahren zur Verringerung der Protein A-*leakage* behandelt bzw. vorbehandelt  
15 werden, verwendet werden. Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung der *low leakage* Protein A-Matrices zur Reinigung besagter Antikörper, chimärer Antikörper-Molekülen, einschließlich deren Fragmente oder Derivate.

### **Beschreibung der Abbildungen**

20 Figur 1 beschreibt das unterschiedliche Liganden-*leakage* von Protein A-Sepharosen, die nicht nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren vorbehandelt wurden.

Die Figuren 2 und 3 beschreiben zwei erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der Protein A-*leakage* einer Protein A-Matrix. Bei Figur 2 handelt es sich um die Beschreibung des erfindungsgemäßen Inkubationstests, bei Figur 3 um die Beschreibung des erfindungsgemäßen  
25 *Small-Scale* Verfahrens.

Figur 4 verdeutlicht den Effekt der Vorbehandlung einer Protein A-Matrix mit hoher und niedriger Protein A-*leakage* auf die Reduktion der Protein A-*leakage*.

Figur 5 zeigt den Einfluß, den eine Behandlung einer Protein A Matrix mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auf die Reduktion der Protein A-*leakage* hat, bei mehrfacher  
30 Beladung der Matrix mit einer biologischen Probe im Small-scale Verfahren.

Die Figuren 6 – 10 zeigen den Effekt der Konzentration von Tween 20, Pluronic F68, Triton-X-100, CHAPS und Polyethylenglycol auf die Reduktion der Protein A-*leakage*.

Figur 11 beschreibt den Einfluß der Behandlungszeit auf die Reduktion der Protein A-*leakage*.

Figur 12 beschreibt den Einfluß der Behandlungstemperatur auf die Reduktion der Protein A-*leakage*. In (A, B) und (C, D) sind jeweils zwei unabhängig durchgeführte Versuche abgebildet.

Figur 13 beschreibt die detergenzabhängige Induktion/Reduktion der Protein A-*leakage* für verschiedene Protein A Matrices.

Figur 14 beschreibt die Reduktion der Protein A-*leakage* in Abhängigkeit der Zeit, der Temperatur und des Spülvolumens, wobei das Spülvolumen unmittelbar von der Behandlungsdauer abhängt.

### Ausführungsbeispiele

**Versuchsbeschreibung:** Das Liganden-*leakage* wurde beispielhaft für Protein A-Matrices in einem Inkubationstest oder „Small-scale Verfahren“ analysiert. Hierzu wird die Chromatographiematrix, vorliegend Protein A-Sepharose, entsprechend der Versuchsbeschreibung / des Versuchsaufbaus der beigefügten Skizzen (Figur 2 und 3) behandelt und anschließend mit einer Lösung (Probe) von Interesse inkubiert bzw. beladen. Als Probe diente beispielhaft Zellkulturmedium oder eine Ernteprobe aus dem Fermentationsprozess:

In Schritt 1 wird die Protein-A Sepharose seriell mit einem Bettvolumen (BV) Harnstoffpuffer (6M), vier BV eines sauren Elutionspuffer (0,1M NaCl, pH 4,0), sechs BV eines physiologischen Equilibrierungspuffer (30 mM Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7 - 8) vorbehandelt.

In Schritt 2 wird die Protein A-Matrix über einen Zeitraum zwischen 4 – 48 Stunden mit einem Detergenz, vornehmlich 0,2% Pluronic bzw. 0,2% Tween 20, bei 25 - 37°C inkubiert/gespült. Dies entsprach ungefähr fünf bis dreißig BV Puffer (Schritt 2).

Nachfolgend in Schritt 3 wird die Matrix mit einem Bettvolumen (BV) des Harnstoffpuffers (6M), vier BV eines sauren Elutionspuffer (0,1M NaCl, pH 4,0) und sechs BV eines neutralen Puffers (30 mM Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7 - 8) gespült.

Zur Bestimmung der Protein A-*leakage* im „Inkubationstest“ wird eine Probe an Protein-A Sepharose einer entsprechend vorbehandelten Matrix entnommen und mit einem Volumen einer spezifischen Probe über eine bestimmte Zeit inkubiert. Vorliegend wurde Zellkulturmedium als



Probe verwendet. Denkbar ist aber auch die Verwendung von saurem Elutionspuffer oder einem beliebigen Puffer. Anschließend wurde die Protein A-Matrix durch Zentrifugation (5 min., 13000 rpm, Eppendorf Rotor F45-24-11) abgetrennt. Das Protein A-leakage wurde nun über die Menge an Protein A in der Probe bestimmt (s.u.).

- 5 Alternativ erfolgt die Bestimmung der Protein A-leakage bei dem „Small scale Verfahren“ direkt in Anlehnung an das verwendete industrielle Reinigungsverfahren. Hierzu wird die Matrix nach den Behandlungsschritten 1-3 (s.o.) mit einem Beladungspuffer beladen, der wahlweise die zu reinigende Substanz enthält. Anschließend wird die Affinitätsmatrix unter Prozessbedingungen mit einem Waschpuffer (30mM Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7-8) gewaschen. Nachfolgend erfolgt  
10 ein Elutionsschritt mit einem sauren Elutionspuffer (0,1 M NaCl, pH 4,0). Das Eluat wird aufgefangen und die Protein A Menge als Maß für die Protein A-leakage bestimmt.

- Die Protein A Bestimmung erfolgte in beiden Fällen über einen „Sandwich Protein A ELISA“ der auch geringe Mengen (ppm) an Protein A detektieren kann. Hierzu wurde ein hochaffiner anti-Protein A-Antikörper an ein Reaktionsgefäß, vornehmlich an eine 96-Loch Mikrotiterplatte  
15 fixiert. Der Protein A-Nachweis erfolgt nach Inkubation der Probe mit dem fixierten anti-Protein A-Antikörper über einen zweiten, ebenfalls hochaffinen anti-Protein A-Antikörper, der zusätzlich mit einem Enzym, beispielsweise einer Peroxidase oder alkalische Phosphatase markiert ist. Entsprechende unmarkierte und Enzymmarkierte anti-Protein A-Antikörper sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise über die Firmen American Research Products, Inc.  
20 (Belmont, USA), Biogenesis Ltd. (Poole, England) oder O.E.M. Concepts, Inc. (New Jersey, USA) zu beziehen. Alternativ kann ein kommerzielles Testkit (ELISA) für den Protein A-Nachweis z.B. über die Fa. ReliGen Corp. (Needham, USA) bezogen werden. Die Durchführung des Test erfolgt hierbei entsprechend den Angaben des Herstellers.

***Ergebnisse: Vorbehandlung von Protein A Sepharose zur Reduktion des Protein A-leakage***

- 25 Das Protein A-leakage Verhalten einer Protein A-Matrix, die ein hohes Protein A-leakage zeigt, kann durch eine kombinierte Vorbehandlung der Affinitätsmatrix mit einem Harnstoff-Puffer, Elutionspuffer, Equilibrierungspuffer und nicht-ionischem Detergenz signifikant reduziert werden (Figur 4). Die gewählte Detergenzkonzentration lag bei 0,2%. Das Protein A-leakage Verhalten einer Protein A-Sepharose, die bereits ein niedriges leakage vor Behandlung gezeigt  
30 hat, bleibt durch die Vorbehandlung unverändert stabil erhalten (Figur 4). Durch die beschriebene Vorbehandlung der Protein A-Matrix wird weder die Aktivität der Affinitätsmatrix noch ihre chromatographische Eigenschaft (Performance) negativ beeinflusst. Die behandelten

Protein A-Sepharosen zeigen über mehrere Beladungs- und Elutionszyklen ein stabiles Liganden-*leakage* (Figur 5) und sind bzgl. ihrer Kapazität und Elutionsverhalten unverändert stabil.

#### *Induktion des Protein A-leakages in Abhängigkeit der Detergenz-Konzentration*

5 Die Induktion des Protein A-*leakage* ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Detergenz. Der optimale Konzentrationsbereich des eingesetzten Detergenz liegt je nach Substanz zwischen 0,001 – 1,0% (siehe Figuren 6 – 10). Die optimale Detergenz-Konzentration wird mit Hilfe des Inkubationstests oder des *Small-scale* Verfahrens oder einem auf einem vergleichbaren Verfahren beruhenden Test für jede Anwendung der Affinitätsmatrix bestimmt.

#### 10 *Zeitabhängigkeit der Protein A-leakage Reaktion*

Die Zeitabhängigkeit der Reaktion/Vorbehandlung der Protein A-Sepharose wurde in Inkubationsversuchen gezeigt. Wird Protein A-Sepharose in Detergenz-haltigem Puffer, beispielsweise in 0,1% Pluronic F68, inkubiert, so ist das *leakage* der Protein A-Sepharose abhängig von der Zeit (Figur 11). Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, dass erst eine  
15 Behandlungszeit (Kontaktzeit) von mindestens 16 bis 24 Std. zu einer deutlichen Reduktion der Protein A-*leakage* führt. Figur 14 zeigt ferner, dass die Kontaktzeit bei 25°C idealerweise 16 bis 48 Std. beträgt. Erhöht man die Temperatur auf über 25°C, z.B. auf 37°C, so verkürzt sich die erforderliche Behandlungszeit beträchtlich auf mindestens 4 Std., liegt idealerweise bei 4 – 16 Std. Ebenso besteht eine direkte Volumenabhängigkeit der Vorbehandlung der Protein A-Matrix  
20 mit Detergenz.

#### *Temperaturabhängigkeit der Protein A-leakage Reaktion*

Die Elution/Induktion des Protein A-*leakage* ist abhängig von der Inkubationstemperatur. Ein Vergleich des Liganden-*leakage* von Protein A-Sepharose in zwei unabhängigen Versuchsserien bei 2-8°C, 25°C (RT) und 37°C bzw. 2-8°C, 37°C, 45°C, 50°C und 55°C zeigt eine direkte  
25 Abhängigkeit des Liganden-*leakage* von der Temperatur: je höher die Inkubationstemperatur, desto effektiver kann instabil oder nicht kovalent gebundenes Protein A aus der Affinitätsmatrix herausgelöst werden (Figur 12). Die ideale Inkubationstemperatur für industrielle Anwendungen liegt bei 20 – 25°C (RT). Bei Bedarf kann die Temperatur auch auf 37°C oder darüber hinaus erhöht werden, beispielsweise auf etwa 50°C oder auch auf etwa 55°C, wodurch sowohl die  
30 Behandlungsdauer als auch das benötigte Spülvolumen bei Erreichen des gleichen Effekts entsprechend reduziert werden können (vgl. auch Fig. 14).

*Vorbehandlung von verschiedenen Protein-A-Matrices*

Die Induktion des Protein A-*leakage* zeigt sich für verschiedene Protein A-Matrices (z.B. wildtyp/ rec. Protein A-Sepharose, MabSelect, etc.) nach erfindungsgemäßer Behandlung der Matrices mit Detergenz (Figur 13).

5

**Literatur**

Diamandis, E.P. und Christopoulos, T.K. (1996). Immunoassay, Academic Press.

Duggleby, C.J. und Jones, S.A. (1983), Cloning and expression of Staphylococcus aureus protein A gene in Escherichia coli. Nucl.Acids. Res. 1983 May 25; 11(10):3065-76.

- 10 Harris und Angel (1989): Protein Purification Methods – A practical approach, IRL Press, Oxford University Press Inc., New York, 1995.

Kemeny, D.M. (1994). ELISA – Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor. Gustav Fischer Verlag.

- 15 Li, R. Dowd, V., Stewart, D.J., Burton, S.J. Lowe, C.R. (1998), Design, synthesis and application of a protein A mimetic. Nat.Biotechnol. 1998 Feb; 16(2):190-5.

Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjoquist J (1983); Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera: J Immunol Methods 1983 Aug 12;62(1):1-13.

Lofdahl, S., Guss, B., Uhlen, M., Philipson, L., Lindberg, M. (1983), Gene for staphylococcal protein A. PNAS, U S A, Feb;80(3):697-701

**Ansprüche**

1. Verfahren zur Behandlung einer Affinitätschromatographie-Matrix zur Verringerung der Liganden-*leakage* mit mindestens einer oberflächenaktiven Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontaktzeit mindestens 4 Std. beträgt.
- 5 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontaktzeit zwischen 4 und 16 Std. beträgt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontaktzeit mindestens 16 Std. beträgt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontaktzeit zwischen 16  
10 und 48 Std. beträgt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 – 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrenstemperatur zwischen etwa 25 und etwa 55°C beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrenstemperatur zwischen etwa 15 und etwa 25°C beträgt.
- 15 7. Verfahren gemäß einer der Ansprüche 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätschromatographie-Matrix mit mindestens 5 – 10 Bettvolumen der oberflächenaktiven Substanz(en) gespült wird.
8. Verfahren gemäß einer der vorherigen Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätschromatographie-Matrix zusätzlich mit einer chaotropen Substanz behandelt wird.
- 20 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätschromatographie-Matrix zusätzlich mit einem für die Affinitätsmatrix stringenten Elutionspuffer behandelt wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätschromatographie-Matrix zusätzlich mit einem neutralen Puffer (pH 6,5 – 8,5) behandelt wird.
- 25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 – 10 dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der chaotropen Substanz um Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid handelt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid in einer Konzentration von 4 – 6 M verwendet wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 – 12, wobei es sich bei dem Elutionspuffer um einen  
30 sauren Elutionspuffer handelt (pH 2,0 – 4,0).

14. Verfahren zur Behandlung einer Affinitätschromatographie-Matrix nach einem der vorherigen Ansprüchen mit den Schritten:

- a) Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer chaotropen Substanz, gefolgt von einem sauren Puffer (pH 2,0 – 4,0) und einem neutralen Puffer (pH 6,5 – 8,5)
- 5 b) Behandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit mindestens 5 - 10 Bettvolumen zumindest einer oberflächenaktiven Substanz für mindestens 4 Std. bei einer Verfahrenstemperatur ab 25 bis 55°C oder für mindestens 16 Std. bei einer Verfahrenstemperatur von unter 25°C.
- c) Nachbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer chaotropen Substanz, gefolgt von einem sauren Puffer (pH 2,0 – 4,0) und einem neutralen Puffer (pH 6,5 – 8,5).

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14, wobei es sich bei der (den) oberflächenaktiven Substanz(en) um ein nicht-ionisches Detergenz oder ein zwitterionisches Detergenz handelt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14, wobei es sich bei der (den) oberflächenaktiven Substanz(en) um ein PEG-Alkylether, ein PEG-Sorbitanfettsäureester, ein Alkylphenyl-PEG-Ether, ein PEO-PPO-Block-Co-Polymere oder um Polyethylenglycol handelt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14, wobei es sich bei der oberflächenaktiven Substanz mindestens um eine der folgenden Substanzen:

- ein PEG-Alkylether wie Polyoxyethylene(23)laurylether (Brij 35) oder Polyoxyl-20-cetostearylether,
- ein PEG-Sorbitanfettsäureester (Polysorbat-Derivat) wie etwa Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Polysorbat 20) oder Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat (Polysorbat 80),
- ein Alkylphenyl-PEG-Ether (Octoxynol-Derivat) wie etwa t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol (Triton-X-100),
- ein Nonylphenol Polyoxyethylenether wie etwa Polyglycolether (Tergitol NP40) oder ein verzweigter Polyoxyethylen-nonylcyclohexylether (Triton N-101),
- ein PEO-PPO-Block-Co-Polymere (Poloxamer-Derivate), wie Polyoxyethylen-polyoxypropylen-block-copolymer (Pluronic F 68, Lutrol F 68, Poloxamer 188, oder Pluronic F 127, Lutrol F 127, Poloxamer 407),

- ein Polyethylenglycol

handelt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14, wobei es sich bei der oberflächenaktiven Substanz zumindest um 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat (CHAPS), oder um 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-2-hydroxy-1-propansulfonat (CHAPSO) handelt.
19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 18, wobei die oberflächenaktive(n) Substanz(en) in einer Konzentration von 0,001 bis 5% (v/v) eingesetzt wird (werden).
20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 17, wobei Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Polysorbat 20) oder Polyoxyethylen(20)sorbitan-monooleat (Polysorbat 80), in einer Konzentration > 0,001 % (v/v), Polyoxyethylen-polyoxypropylen-block-copolymer (Pluronic F 68, Lutrol F 68, Poloxamer 188, oder Pluronic F 127, Lutrol F 127, Poloxamer 407), t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol (Triton-X-100) oder Polyethylenglycol in einer Konzentration von > 0,001 % (v/v) eingesetzt wird.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 17, wobei Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Polysorbat 20) oder Polyoxyethylen(20)sorbitan-monooleat (Polysorbat 80) in einer Konzentration von 0,001 - 0,5 % (v/v), Polyoxyethylen-polyoxypropylen-block-copolymer (Pluronic F 68, Lutrol F 68, Poloxamer 188 oder Pluronic F 127, Lutrol F 127, Poloxamer 407,) und t-Octyl-phenoxy-polyethoxyethanol (Triton-X-100) in einer Konzentration von 0,001 - 0,1% (v/v) eingesetzt wird und Polyethylenglycol in einer Konzentration von 0,001 - 1% (v/v) eingesetzt wird.
22. Verfahren gemäß der einer der Ansprüche 1 - 14 sowie Anspruch 18, wobei das zwitterionische Detergenz in einer Konzentration von 0,01 bis 5% eingesetzt wird.
23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 14 sowie Anspruch 18, wobei 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat (CHAPS) oder 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-2-hydroxy-1-propansulfonat (CHAPSO) in einer Konzentration > 0,01% (v/v) eingesetzt werden.
24. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 14 sowie Anspruch 18, wobei 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat (CHAPS) oder 3-(3-Cholamido-propyl)-dimethyl-ammonio-2-hydroxy-1-propansulfonat (CHAPSO) in einer Konzentration von 0,01 - 1% (v/v) eingesetzt werden.

25. Verfahren gemäß einer der vorherigen Ansprüche 1 - 24, wobei es sich bei der Affinitätschromatographie-Matrix um eine Protein A-Matrix handelt.
26. Verfahren gemäß Anspruch 25, wobei die Protein A-Matrix immobilisiertes wildtyp oder rekombinant hergestelltes Protein A enthält.
- 5 27. Verfahren gemäß Ansprüche 25 und 26, wobei es sich bei der Affinitätschromatographie-Matrix um Protein A handelt, das an Agarose, oder an ein Polysaccharid, oder an Dextran, oder an Silica-Gel, oder an Glas-beads gekoppelt ist.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, wobei es sich bei der Affinitätschromatographie-Matrix um Protein A-Sepharose oder STREAMLINE™ rProtein A, oder MabSelect, oder Poros A  
10 handelt.
29. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden-*leakage* nach entsprechender Vorbehandlung auf einen Wert kleiner 80 ng /mg Affinitätsmatrix verringert wird.
30. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden-  
15 *leakage* nach entsprechender Vorbehandlung auf einen Wert kleiner 40 ng/mg Affinitätsmatrix verringert wird.
31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden-*leakage* nach entsprechender Vorbehandlung auf einen Wert kleiner 20 ng/mg Affinitätsmatrix verringert wird.
- 20 32. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden-*leakage* nach entsprechender Vorbehandlung auf einen Wert kleiner 10 ng/mg Affinitätsmatrix verringert wird.
33. *Low leakage* Affinitätschromatographie-Matrix, die nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 24 behandelt wurde.
- 25 34. *Low leakage* Protein A-Matrix, die nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 24 behandelt wurde.
35. *Low leakage* Protein A-Sepharose oder eine Protein A-Matrices, wie MabSelect, STREAMLINE™ rProtein A, Poros A, die nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1-24 behandelt wurde.

36. Methode zur Bestimmung der Liganden-*leakage* mit den Schritten:

- a) Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 28;
- b) Inkubation der vorbehandelten Affinitätschromatographie-Matrix mit einer zusätzlichen Lösung (Probe);
- c) Quantifizierung des Liganden in der zusätzlichen Lösung (Probe) über einen geeigneten quantitativen Test.

37. Methode gemäß Anspruch 36, wobei es sich bei der zusätzlichen Lösung (Probe) um das Zwischenprodukt handelt, welches bei dem jeweiligen Chromatographieverfahren als Ausgangsmaterial verwendet wird.

38. Methode nach einem der Ansprüche 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem quantitativen Test um einen Liganden-spezifischen ELISA handelt.

39. Methode zur Bestimmung des Protein A-*leakage* gemäß einem der Ansprüche 36 - 38.

40. Methode zur Bestimmung der Protein A-*leakage* nach dem in Figur 2 der Zeichnungen dargestellten Verfahren.

41. Methode zur Bestimmung der Liganden-*leakage* mit den Schritten:

- a) Vorbehandlung der Affinitätschromatographie-Matrix nach einem Verfahren gemäß der einem der Ansprüche 1 - 28;
- b) Beladen der Affinitätschromatographie-Matrix mit einer zu reinigenden Substanz;
- c) Waschen der Affinitätschromatographie-Matrix mit einem stringenten Waschpuffer
- d) Inkubation der Affinitätschromatographie-Matrix mit einem Elutionspuffer
- e) Quantifizierung des Liganden im Elutionspuffer über einen geeigneten quantitativen Test.

42. Methode gemäß Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem quantitativen Test um einen Liganden-spezifischen ELISA handelt.

43. Methode zur Bestimmung des Protein A-*leakage* nach einem der Ansprüche 41 oder 42.

44. Methode zur Bestimmung der Protein A-*leakage* nach dem in Figur 3 der Zeichnungen dargestellten Verfahren.

45. Verwendung eines Verfahrens gemäß der Ansprüche 1 - 32 bei der Reinigung von biopharmazeutischen Produkten.



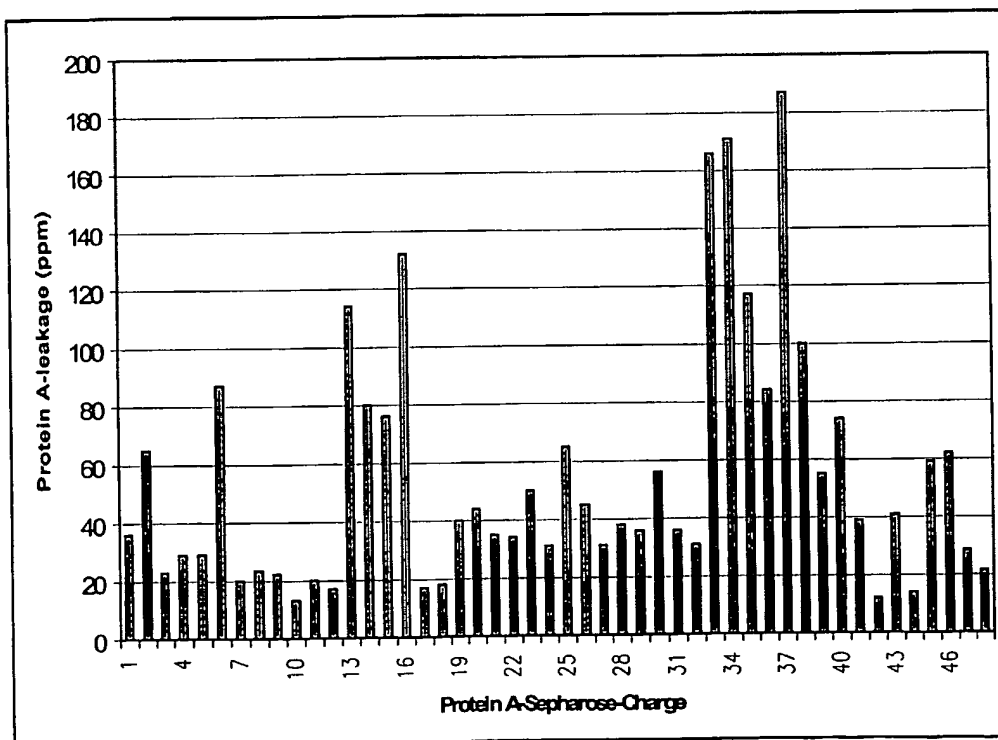
46. Verwendung eines Verfahrens gemäß der Ansprüche 1 - 32 bei der Reinigung von Antikörpern, Chimären-Antikörpern, oder deren Fragmente oder Derivate.
47. Verwendung von *low leakage* Affinitätschromatographie-Matrices gemäß einem der Ansprüche 33 - 35 bei der Reinigung von biopharmazeutischen Produkten.
- 5 48. Verwendung von *low leakage* Protein A-Matrices gemäß einem der Ansprüche 34 und 35 bei der Reinigung von Antikörpern, Chimären-Antikörpern, oder deren Fragmenten oder Derivate.

Figur 1: Vergleich des Protein A-leakage-Verhaltens von verschiedene Protein A-Sephrose Chargen

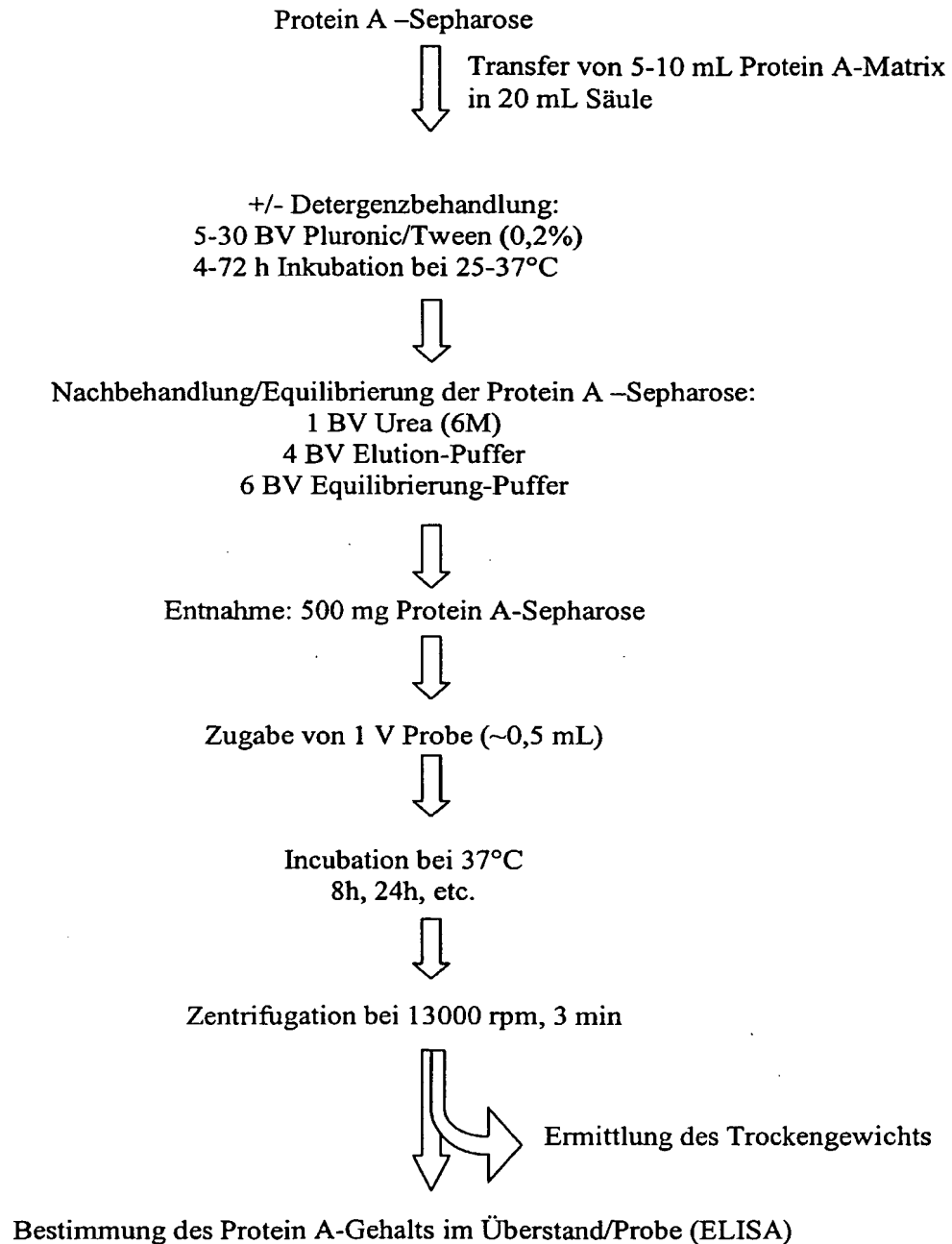
A)

Protein A-Sephrose-Charge	Protein A-leakage (ppm)	Protein A-Sephrose-Charge	Protein A-leakage (ppm)
1	36	25	65
2	65	26	45
3	23	27	31
4	29	28	38
5	29	29	36
6	87	30	56
7	20	31	36
8	23	32	31
9	22	33	166
10	13	34	171
11	20	35	117
12	17	36	84
13	114	37	187
14	80	38	100
15	76	39	55
16	132	40	74
17	17	41	39
18	18	42	12
19	40	43	41
20	44	44	14
21	35	45	59
22	34	46	62
23	50	47	29
24	31	48	22

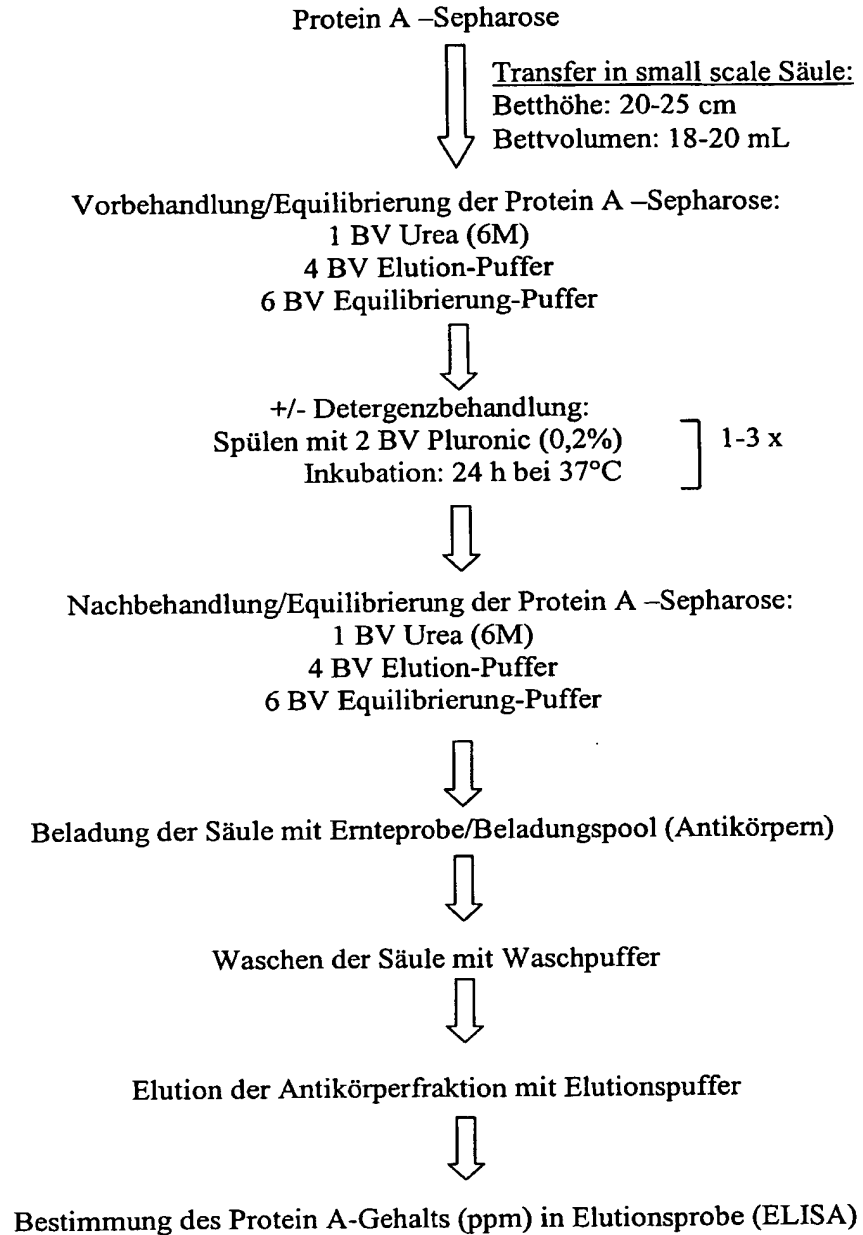
B)



Figur 2: Versuchsaufbau Inkubationstest



Figur 3: Versuchsaufbau: Small Scale-Versuch (Beladungs-/Elutionstest)

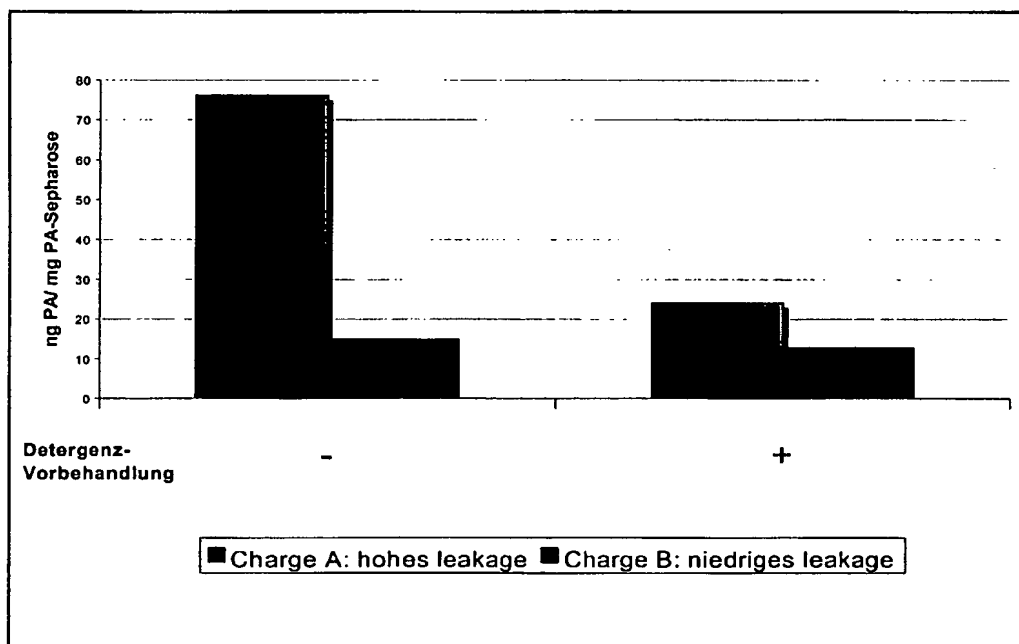


Figur 4: Vorbehandlung der Protein A-Sepharose mit PBS-Tween (0,2%)  
- Einfluß von Detergenz auf Protein A-leakage -

A)

Protein A-Sepharose	Probe	Vorbeh. mit PBS-Tween	Protein A-Gehalt (ng Prot.A / mg Prot.A Sepharose)
Charge A	Medium	-	76
hohes leakage	Medium	+	24
Charge B	Medium	-	15
niedriges leakage	Medium	+	13

B)

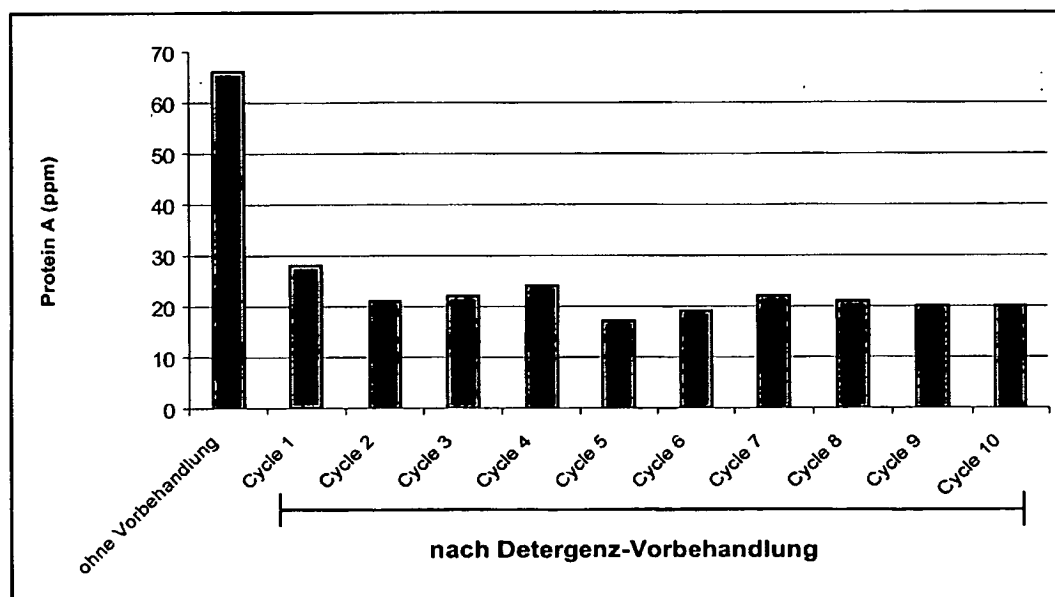


Figur 5: Einfluss der Vorbehandlung von Protein A-Matrix auf die Protein A-leakage-Stabilität der Chromatographiematrix bei Mehrfachbehandlung (Cycles)

A)

Small Scale Test	Protein A-leakage (ppm)
ohne Vorbehandlung	66
Cycle 1	28
Cycle 2	21
Cycle 3	22
Cycle 4	24
Cycle 5	17
Cycle 6	19
Cycle 7	22
Cycle 8	21
Cycle 9	20
Cycle 10	20

B)

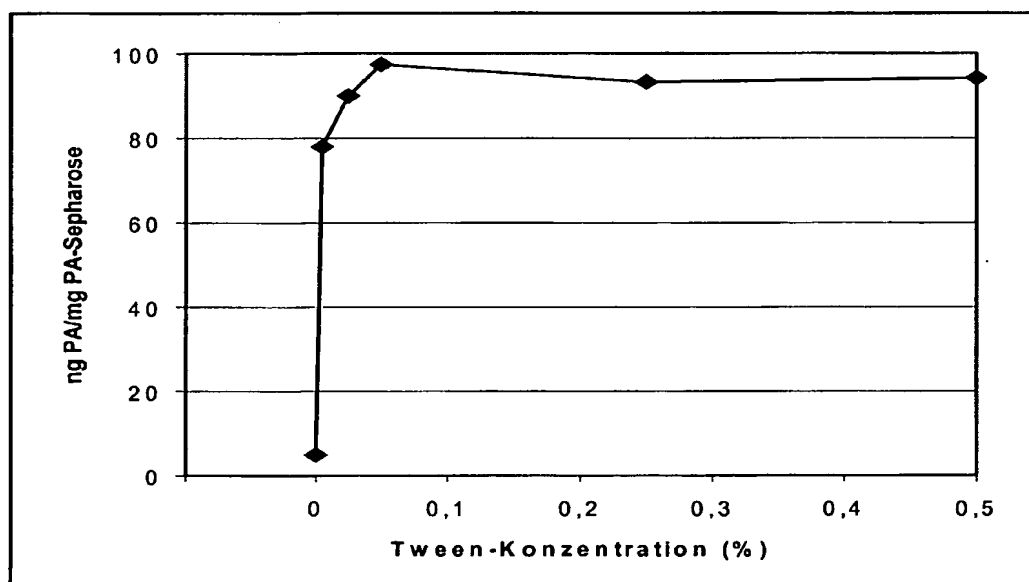


Figur 6: Protein A-leakage in Abhängigkeit der Tween-Konzentration

A)

Tween-Konzentration (%)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sepharose)
0	5
0,005	78
0,025	90
0,05	97
0,25	93
0,5	94

B)

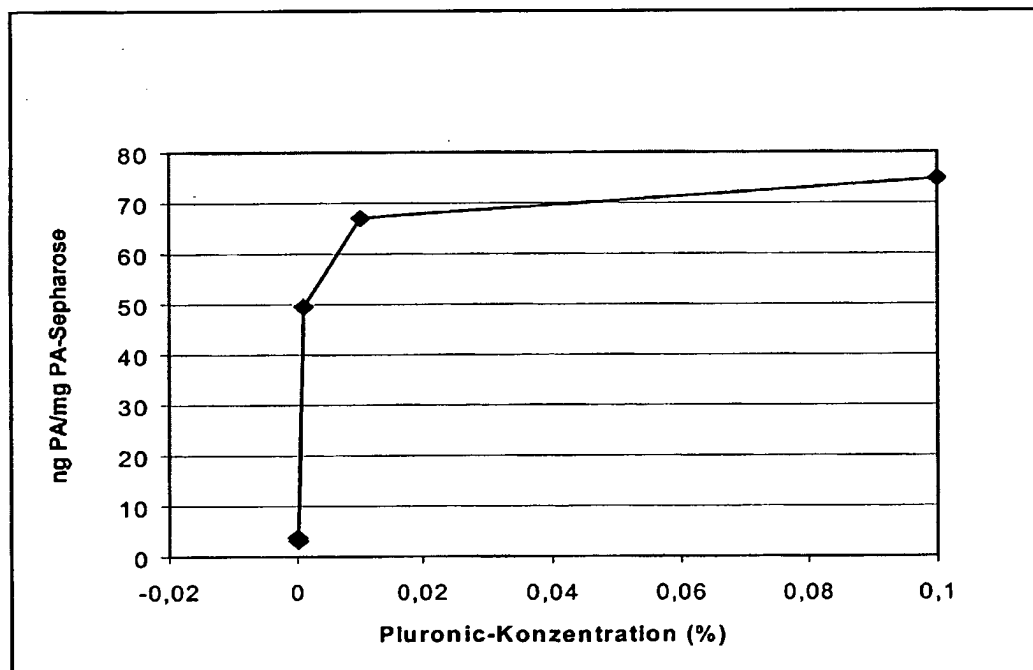


Figur 7: Protein A-leakage in Abhängigkeit der Pluronic-Konzentration

A)

Pluronic-Konzentration (%)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sepharose)
0,00001	4
0,0001	3
0,001	49
0,01	67
0,1	75

B)



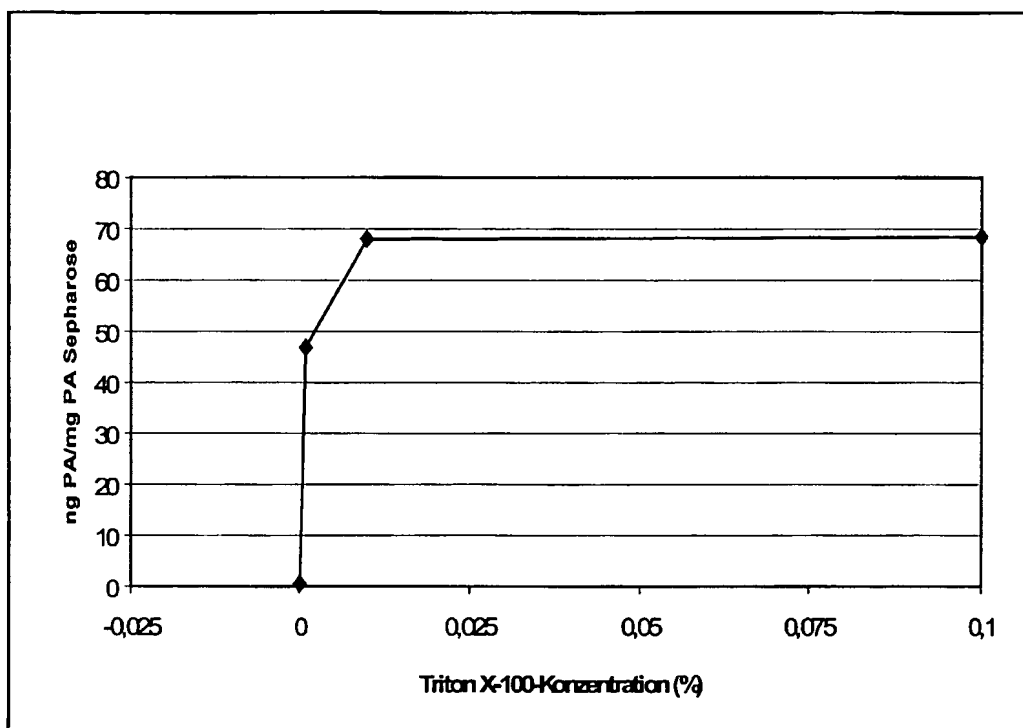


Figur 8: Protein A-leakage in Abhängigkeit der Triton X-100-Konzentration

A)

Triton X-100-Konzentration (%)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sephareose)
0,0001	1
0,001	47
0,01	68
0,1	68

B)

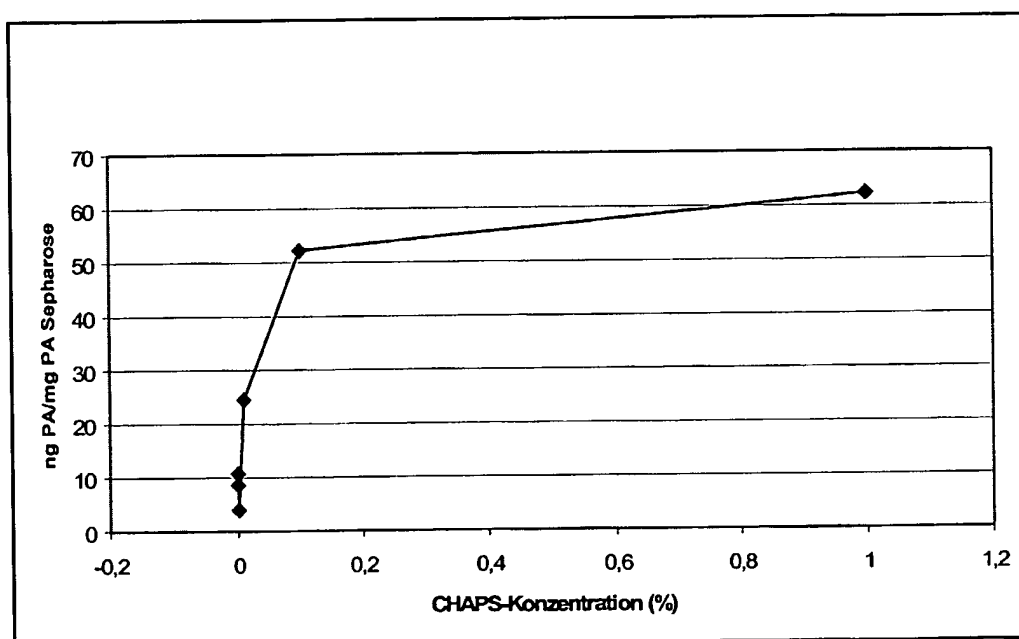


Figur 9: Protein A-leakage in Abhängigkeit der CHAPS-Konzentration

A)

CHAPS-Konzentration (%)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sepharose)
0	9
0,0001	11
0,001	4
0,01	25
0,1	52
1	62

B)

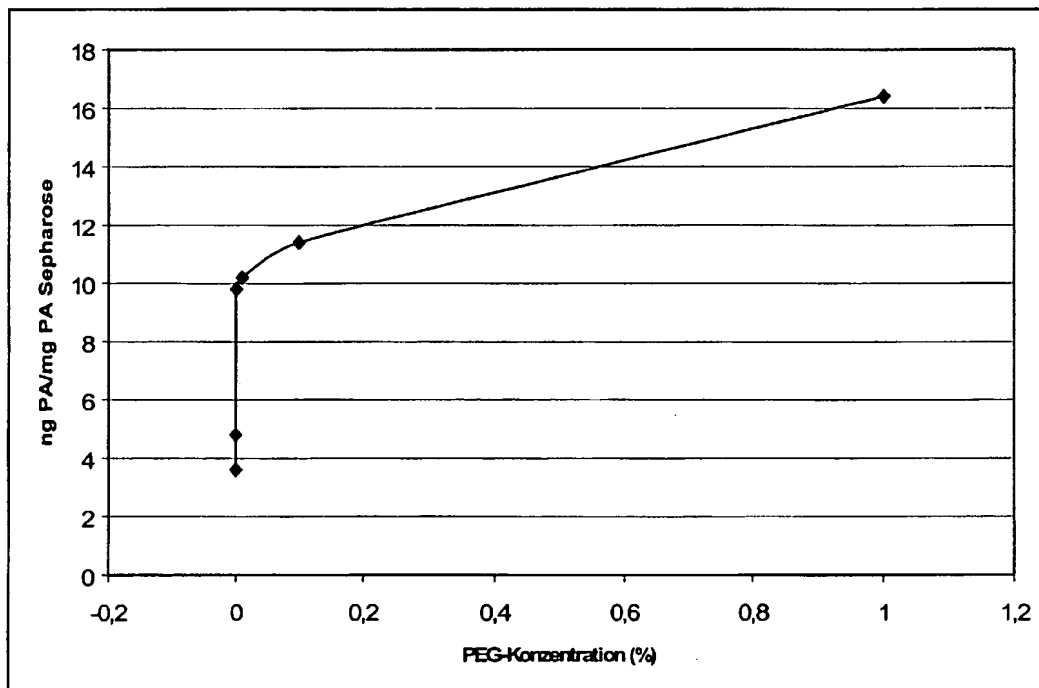


Figur 10: Protein A-leakage in Abhängigkeit der PEG-Konzentration (PEG 8000)

A)

PEG-Konzentration (%)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sepharose)
0	4
0,0001	5
0,001	10
0,01	10
0,1	11
1	16

B)

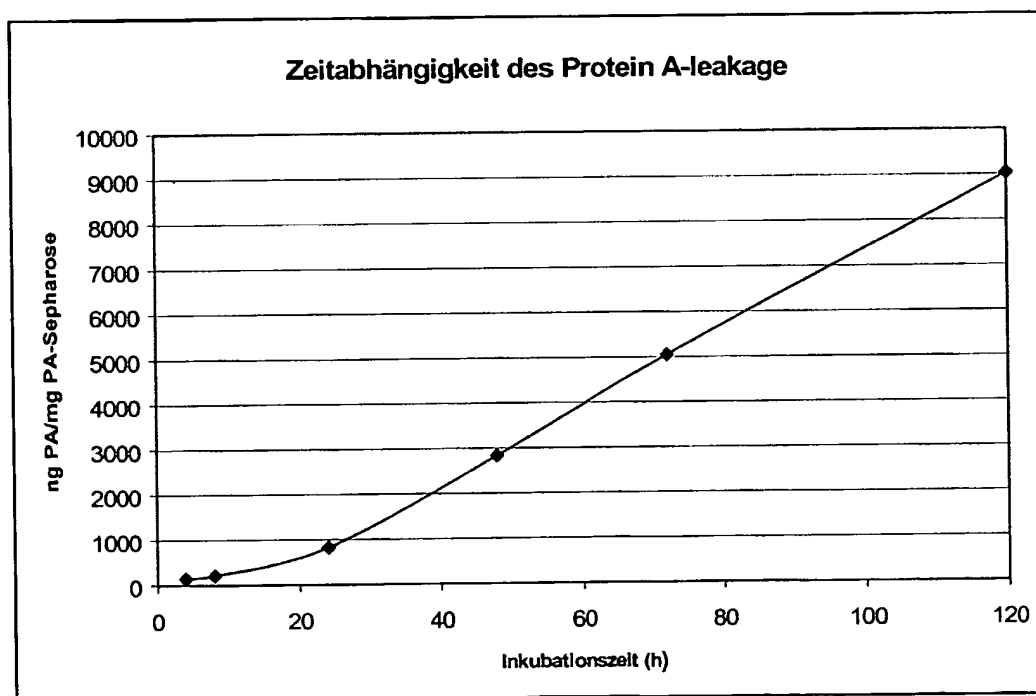


Figur 11: Zeitabhängigkeit der Protein A-leakage-Reaktion

A)

Inkubationszeit (h)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sepharose)
4	143
8	203
24	814
48	2829
72	5040
120	9030

B)

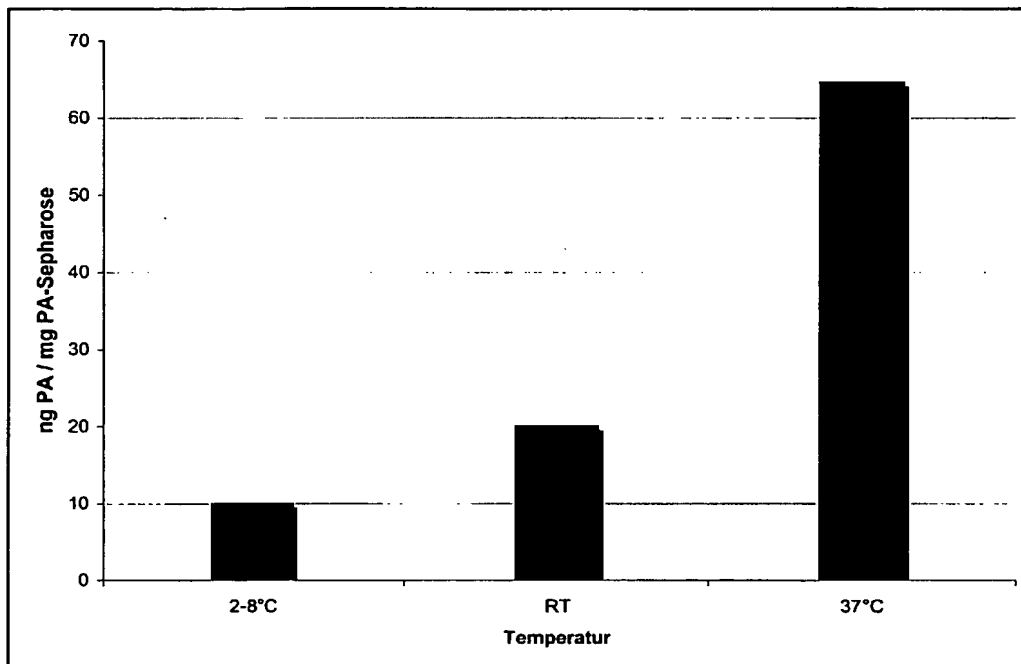


Figur 12: Einfluss der Inkubationstemperatur auf das Protein A-leakage

A)

Temperatur (°C)	Protein A-leakage (ng Prot.A/mg Prot.A-Sepharose)
2-8	10
25 (RT)	20
37	65

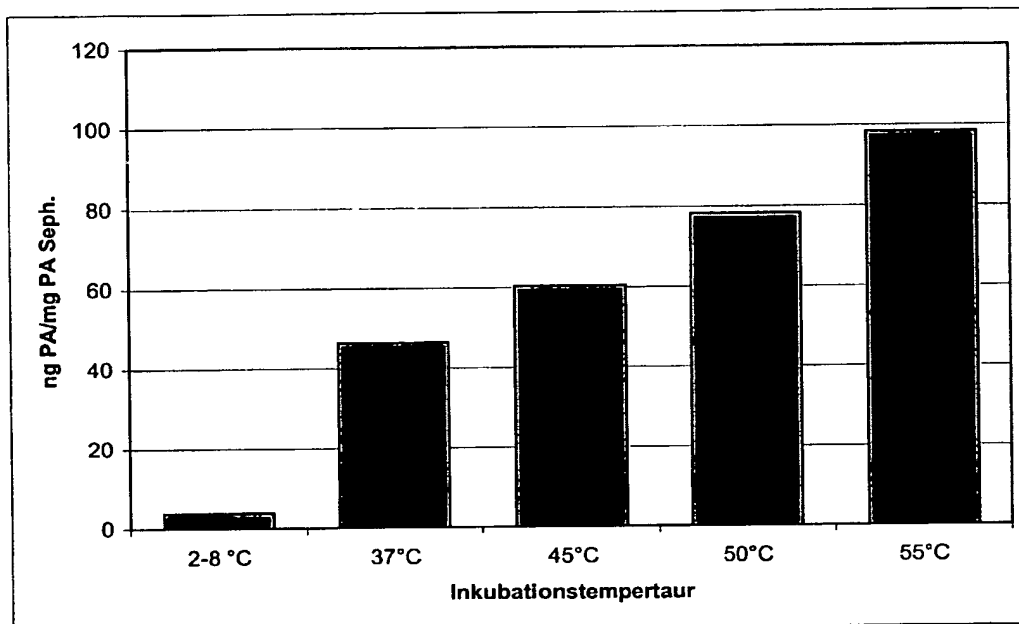
B)



C)

Inkubations Temperatur	ng PA/mg PA Seph.	MW
2-8°C	4,1 3,4	3,8
37°C	47,8 44,9	46,3
45°C	58,6 62,0	60,3
50°C	77,1 79,3	78,2
55°C	98,6 97,9	98,3

D)

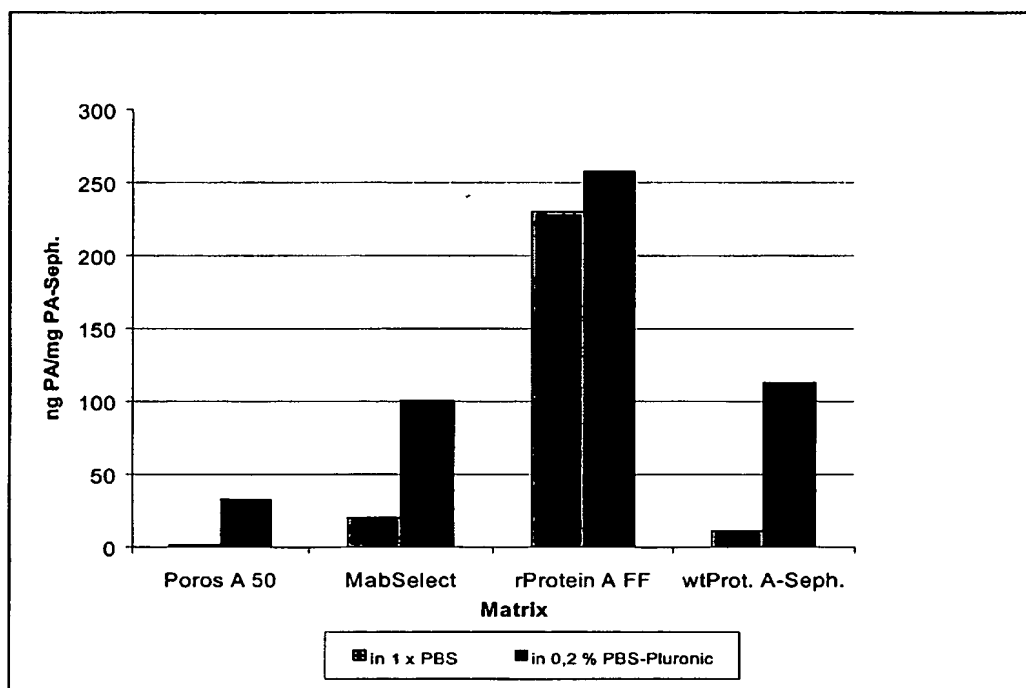


Figur 13: Vergleich der Induzierbarkeit der Protein A-leakage durch Detergenz bei verschiedenen Protein A-Matrices

A)

Matrix	Protein A-leakage (ng PA/mg PA-Sepharose)	
	PBS	PBS-Pluronic (0,2 %)
Poros A 50	2	33
MabSelect	20	101
rProtein A FF	230	257
wtProt. A-Seph.	11	113

B)



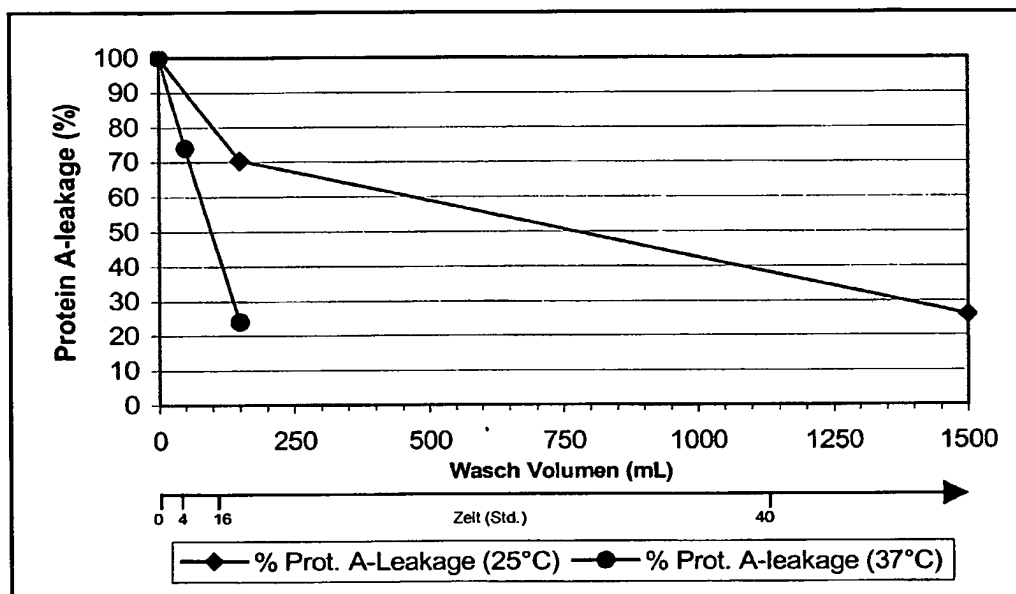
Figur 14: Protein A-leakage nach Vorbehandlung von Protein A Sepharose in Abhängigkeit der Zeit, der Temperatur und Spülvolumens

A)

Wasch Vol. (mL)	% Protein A-leakage (25°C)	% Protein A-leakage (37°C)
0	100*	100*
50	-	74
150	70	24
1500	26	-
3000	37	-

\*Die Protein A-leakage-Rate ohne Vorbehandlung der Matrix wird auf 100% gesetzt (= Ausgangswert)

B)





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12594

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 B01J20/32 G01N30/48 G01N30/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J G01N B01D C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, MEDLINE, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Streamline rProtein A", AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, UPPSALA, SWEDEN XP002233246 cited in the application  page 5, right-hand column ---	1,8,11, 12, 25-29, 33-36, 38-48
A	LIHME A ET AL: "Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, BIOMEDICAL APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 376, 1986, pages 299-305, XP002122286 page 303 -page 304 --- -/--	1,25-35, 45-48



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 2003

Date of mailing of the international search report

08/04/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12594

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE COMPENDEX 'Online! ENGINEERING INFORMATION, INC., NEW YORK, NY, US; FAHRNER ROBERT L ET AL: "Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation, and comparison with a packed bed method" Database accession no. E2000345233929 XP002235909 abstract &amp; J BIOTECHNOL; JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 1999 ELSEVIER SCI B.V., AMSTERDAM, NETHERLANDS, vol. 75, no. 2, 1999, pages 273-280,</p>	33-35, 48
A	<p>EP 0 345 549 A (MILES INC) 13 December 1989 (1989-12-13) the whole document</p>	36-44
A	<p>WO 94 28118 A (LODESKROKLAAN) 8 December 1994 (1994-12-08) claim 8</p>	1
A	<p>EP 0 105 736 A (AKZONA INC) 18 April 1984 (1984-04-18) page 4, line 1 -page 5, line 25</p>	1
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1980 KOWAL R ET AL: "STABILIZATION OF PROTEINS IMMOBILIZED ON SEPHAROSE FROM LEAKAGE BY GLUTARALDEHYDE CROSS LINKING" Database accession no. PREV198070007208 XP002232791 abstract &amp; ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 102, no. 1, 1980, pages 72-76, ISSN: 0003-2697</p>	

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12594

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; July 1991 (1991-07) GOLDBERG M ET AL: "Specific interchain cross-linking of antibodies using bismaleimides. Repression of ligand leakage in immunoaffinity chromatography." Database accession no. NLM1772910 XP002232792 abstract &amp; BIOCONJUGATE CHEMISTRY. UNITED STATES 1991 JUL-AUG, vol. 2, no. 4, July 1991 (1991-07), pages 275-280, ISSN: 1043-1802</p> <p>-----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No  
 PCT/EP 02/12594

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0345549	A	13-12-1989	US 4983722 A	08-01-1991
			AT 121752 T	15-05-1995
			CA 1339188 A1	29-07-1997
			DE 68922338 D1	01-06-1995
			DE 68922338 T2	31-08-1995
			EP 0345549 A2	13-12-1989
			ES 2071628 T3	01-07-1995
			JP 2084193 A	26-03-1990
			JP 2664478 B2	15-10-1997
			US 5115101 A	19-05-1992
WO 9428118	A	08-12-1994	AT 160582 T	15-12-1997
			AU 6721894 A	20-12-1994
			DE 69407038 D1	08-01-1998
			DE 69407038 T2	16-04-1998
			DK 698090 T3	10-08-1998
			WO 9428118 A1	08-12-1994
			EP 0698090 A1	28-02-1996
			ES 2109698 T3	16-01-1998
			GR 3025987 T3	30-04-1998
			JP 8511159 T	26-11-1996
			US 5773266 A	30-06-1998
EP 0105736	A	18-04-1984	US 4539294 A	03-09-1985
			BR 8305158 A	02-05-1984
			CA 1223382 A1	23-06-1987
			EP 0105736 A1	18-04-1984
			JP 1778065 C	28-07-1993
			JP 4031670 B	27-05-1992
			JP 59098095 A	06-06-1984

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12594

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 B01J20/32 G01N30/48 G01N30/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01J G01N B01D C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, MEDLINE, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	"Streamline rProtein A", AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, UPPSALA, SWEDEN XP002233246 in der Anmeldung erwähnt  Seite 5, rechte Spalte	1,8,11, 12, 25-29, 33-36, 38-48
A	LIHME A ET AL: "Divinilsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, BIOMEDICAL APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 376, 1986, Seiten 299-305, XP002122286 Seite 303 -Seite 304  --- -/--	1,25-35, 45-48

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. März 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/04/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hilgenga, K

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12594

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE COMPENDEX 'Online! ENGINEERING INFORMATION, INC., NEW YORK, NY, US; FAHRNER ROBERT L ET AL: "Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation, and comparison with a packed bed method" Database accession no. E2000345233929 XP002235909 Zusammenfassung &amp; J BIOTECHNOL; JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 1999 ELSEVIER SCI B.V., AMSTERDAM, NETHERLANDS, Bd. 75, Nr. 2, 1999, Seiten 273-280,</p> <p>---</p>	33-35, 48
A	<p>EP 0 345 549 A (MILES INC) 13. Dezember 1989 (1989-12-13) das ganze Dokument</p> <p>---</p>	36-44
A	<p>WO 94 28118 A (LODESKROKLAAN) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) Anspruch 8</p> <p>---</p>	1
A	<p>EP 0 105 736 A (AKZONA INC) 18. April 1984 (1984-04-18) Seite 4, Zeile 1 -Seite 5, Zeile 25</p> <p>---</p>	1
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1980 KOWAL R ET AL: "STABILIZATION OF PROTEINS IMMOBILIZED ON SEPHAROSE FROM LEAKAGE BY GLUTARALDEHYDE CROSS LINKING" Database accession no. PREV198070007208 XP002232791 Zusammenfassung &amp; ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 102, Nr. 1, 1980, Seiten 72-76, ISSN: 0003-2697</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12594

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online!  US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM),  BETHESDA, MD, US; Juli 1991 (1991-07)  GOLDBERG M ET AL: "Specific interchain  cross-linking of antibodies using  bismaleimides. Repression of ligand  leakage in immunoaffinity chromatography."  Database accession no. NLM1772910  XP002232792  Zusammenfassung  &amp; BIOCONJUGATE CHEMISTRY. UNITED STATES  1991 JUL-AUG,  Bd. 2, Nr. 4, Juli 1991 (1991-07), Seiten  275-280,  ISSN: 1043-1802</p>	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12594

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0345549	A	13-12-1989	US 4983722 A 08-01-1991
			AT 121752 T 15-05-1995
			CA 1339188 A1 29-07-1997
			DE 68922338 D1 01-06-1995
			DE 68922338 T2 31-08-1995
			EP 0345549 A2 13-12-1989
			ES 2071628 T3 01-07-1995
			JP 2084193 A 26-03-1990
			JP 2664478 B2 15-10-1997
			US 5115101 A 19-05-1992
WO 9428118	A	08-12-1994	AT 160582 T 15-12-1997
			AU 6721894 A 20-12-1994
			DE 69407038 D1 08-01-1998
			DE 69407038 T2 16-04-1998
			DK 698090 T3 10-08-1998
			WO 9428118 A1 08-12-1994
			EP 0698090 A1 28-02-1996
			ES 2109698 T3 16-01-1998
			GR 3025987 T3 30-04-1998
			JP 8511159 T 26-11-1996
			US 5773266 A 30-06-1998
EP 0105736	A	18-04-1984	US 4539294 A 03-09-1985
			BR 8305158 A 02-05-1984
			CA 1223382 A1 23-06-1987
			EP 0105736 A1 18-04-1984
			JP 1778065 C 28-07-1993
			JP 4031670 B 27-05-1992
			JP 59098095 A 06-06-1984



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**